

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



TESIS DOCTORAL

**Aplicaciones del estudio de la ultraestructura y composición de la
cáscara de los huevos de quebrantahuesos ("Gypaetus barbatus") en la
conservación de la especie**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mauro Hernández Segovia

Directores

**Manuel Pizarro Díaz
María Castaño Rosado**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGIA ANIMAL



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE**
MADRID

APLICACIONES DEL ESTUDIO DE LA ULTRAESTRUCTURA Y COMPOSICION DE LA CASCARA DE LOS HUEVOS DE QUEBRANTAHUESOS (*Gypaetus barbatus*) EN LA CONSERVACION DE LA ESPECIE

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

Mauro Hernández Segovia

Dirigida por los Doctores

**Manuel Pizarro Díaz
María Castaño Rosado**

Madrid, 2015.

Dedico esta Tesis:

A Begoña, por todo su apoyo, dedicación y cariño.

A Rafael Heredia, verdadero pionero de la conservación en España.

A Jordi Pont, Silvia Cornell, Guzman Riu, Joan Martinez, Anna Servent, y
Llorenç Ricou, del Cos d'Agents Rurals de Catalunya.

“El cielo nos contempla por los ojos de acero y sangre
de ese último Quebrantahuesos,
fiel a una península de locos.
Que no se nos muera.
Que no se diga.”

FRANCISCO UMBRAL

Esta tesis recoge parte del trabajo que realicé con el Quebrantahuesos durante veinticuatro años. Durante este tiempo tuve ocasión de conocer y de disfrutar de un montón de personas con las que he compartido mi fascinación por el Quebrantahuesos, los Pirineos, las rapaces, las aves y la naturaleza en general. A muchos de ellos les debo mucho, por lo que me han enseñado o por lo que he compartido con ellos. A todos ellos quiero agradecer sus enseñanzas y los buenos momentos que hemos vivido.

Una mención especial merece Begoña Chinchilla, con la he compartido media vida. Ella ha sido mi apoyo y mi motivación en todos los proyectos importantes que he emprendido en la vida.

Las personas con las que mas estrechamente he trabajado durante todos estos años han sido Rafael Heredia y Antoni Margalida. Rafa fue el que me introdujo en el mundo del Quebrantahuesos; Toni, en el complejo mundo de la investigación en biología y la publicación científica. Ellos dos deberían figurar como coautores de la Tesis.

Julio Guiral fue el que me apoyó y animó en las fases iniciales del trabajo y me abrió las puertas de la Diputación General de Aragón. Matilde Cabrera me dio la oportunidad de trabajar al frente del Centro de Recuperación de La Alfranca, donde se rehabilitaron los primeros Quebrantahuesos heridos y donde se incubaron las primeras puestas rescatadas. Francisco Hernández y Rafael Hidalgo también colaboraron de forma decisiva para el rastreo de puestas y la obtención de muestras de huevos antiguos depositados en museos. El testigo lo tomaron Ignacio Navascués y Paloma Barrachina, que fueron de valioso apoyo en las labores administrativas y el trabajo de campo en los años siguientes. José María Peiró, del Centro de Sanidad Animal de Zaragoza, analizó los primeros huevos y me instruyó en cromatografía de gases para que pudiera continuar después con los análisis de pesticidas y tóxicos en mi propio laboratorio. Las necropsias y obtención de muestras de huevos en Aragón fueron posibles gracias a la colaboración del personal del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de La Alfranca, en especial de José Manuel Sánchez y de Chavier González.

En Cataluña debo agradecer la colaboración incondicional que siempre tuve por parte de Jordi Ruiz, Antoni Margalida, Diego García, Xavier Marco y Manel Pomarol. En el Centre de Recuperació de Fauna Silvestre de Vallcalent, Lleida, tuve mi segunda casa, y es justo agradecer el apoyo y la confianza que siempre tuve de la persona que estaba al frente, Damià Sánchez, así como de todo el personal que allí trabajaba.

El Cos d'Agents Rurals me hizo su hijo adoptivo. Para mi era un orgullo ser conocido como el "veterinario de los rurales". Si no los he mencionado antes es porque he querido seguir un orden cronológico, porque en lo personal, Jordi Pont, Silvia Cornell, Guzman Riu, Joan Martinez, Anna Servent, y Llorenç Ricou merecen mi mas profundo agradecimiento

por la oportunidad que me dieron de trabajar con gente tan excepcional, en lo profesional y en lo humano. Quizás, la década larga que estuve con ellos ha sido la mas productiva y satisfactoria de mi carrera.

Tuve también el apoyo incondicional y la ayuda de Martine Razin durante todo el tiempo que trabajé con el Quebranta, y me dio la oportunidad de trabajar en la vertiente francesa de los Pirineos. Martine ha realizado una labor encomiable a favor del Quebrantahuesos en Francia y, junto a Michel Terrasse, han sido, en gran parte, los artífices de que la especie se recuperara en los Pirineos franceses. Ambos siempre me defendían como profesional de referencia fuera de nuestras fronteras.

Durante muchos años trabajé en el Servicio de Vida Silvestre del ICONA, primero, y la Dirección General de Biodiversidad del Ministerio de Medio Ambiente, después; hasta su disolución, fue mi base de operaciones. Allí trabajé estrechamente con Luis Mariano González, Borja Heredia, José Luis González, Victor García, Javier Oria, Alberto Fernández-Arias, José Manuel de Benito, Roberto Sánchez, Jesús Serrada, Miguel Aymerich y Maite Manzanares. Quiero agradecerles a todos ellos su apoyo y compañerismo durante todos estos años.

El trabajo de campo ha sido una parte fundamental en la conservación del Quebrantahuesos, y muchas personas nos hemos beneficiado de la enorme labor que han realizado innumerables personas en el día a día en el campo. Esta Tesis es un claro ejemplo, ya que no hubiera sido posible, ni siquiera plantearla, si no es por aquellos que lo han dado todo por seguir una pareja, vigilar un nido, recoger unas muestras, realizar aportes de alimento, recoger los ejemplares muertos o heridos, realizar el seguimiento radiotelemétrico y un sinfín de tareas en las que han mostrado una gran perseverancia. Mi agradecimiento al Fondo Amigos del Buitre, a David García, al Cos d'Agents Rurals de la Generalitat de Catalunya, al Grupo de Rescate de Montaña (GREIM) de la Guardia Civil, al Guarderío de Medio Ambiente de la Comunidad Foral de Navarra, en especial a Iosu Antón, a la Guardería del Parque Nacional de Ordesa, en especial a José María Miranda y los Agentes de Protección de la Naturaleza de Aragón, por toda su dedicación con el Quebrantahuesos y la aportación que han realizado en mi trabajo.

La obtención de muestras de huevos antiguos depositadas en museos fue posible gracias a la colaboración Lloyd Kiff (Western Fundation for Vertebrate Ecology, California, USA), C. Sudre y el Dr P. Dalous (Museum d'Historie Naturelle de Tolouse, Francia), Louis de Roguin (Museum d'Historie Naturelle de Ginebra, Suiza), Marcel Güntert (Museum d'Historie Naturelle de Berna, Suiza) y G. Rheinwald (Museum Alexander Koenig de Bonn, Alemania). Por su parte, Michael P. Walters (British Museum, Natural History, Tring, UK) y la Dra M. L. Guerin proporcionaron abundante información y datos morfométricos sobre las puestas y huevos depositados en diversos museos del mundo.

Por último, agradecer la paciencia, dedicación y profesionalidad de Josefo Bedoya y Laura Tormos, técnicos de microscopía electrónica del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (CSIC), por las interminables horas de trabajo frente al microscopio electrónico durante mas de 20 años, y a Ignacio Doadrio el que nos permitiera acceder al Servicio de Microscopia Electrónica del Museo.

Manuel Pizarro y María Castaño, directores de esta Tesis, realizaron aportaciones importantes al manuscrito y Ricardo García Mata y Pedro Cuesta Calvo, del Servicio de

Apoyo a la Investigación de la UCM, contribuyeron de forma notable al estudio estadístico.

Este trabajo se ha realizado en el Laboratorio Forense de Vida Silvestre (Las Matas, Madrid) y fue financiado, primero, por el Departamento de Medio Ambiente de la Diputación General de Aragón en el marco de los proyectos LIFE 94/NAT/E "*Programa de Conservación de los Vertebrados Amenazados en los Pirineos*" (periodo 1994-1998) y LIFE 98/NAT/E/005296 "*Conservación del Quebrantahuesos en los Pirineos*" (periodo 1998-2002), y después, por la Dirección General de Biodiversidad del Gobierno de Aragón (período 2003-2004) y por la Dirección General de Biodiversidad del Ministerio de Medio Ambiente (2003-2009).

INDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. BIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN DEL QUEBRANTAHUESOS	9
2.1. Morfología y Taxonomía	10
2.2. Coloración del Plumaje	12
2.3. Dieta y Alimentación	15
2.4. Biología de la Reproducción	21
2.5. Situación en Europa	28
2.6. Situación en de la población en España	30
2.7. Objetivos de la Tesis	36
CAPÍTULO 3. LA ULTRAESTRUCTURA DE LA CÁSCARA DEL HUEVO DE LAS AVES	39
3.1. La cáscara del huevo de las aves	40
3.2. Organización ultraestructural de la cáscara del huevo	42
3.2.1. Membranas testáceas	52
3.2.2. Capa mamilar y conos basales	54
3.2.3. Capa palizada	58
3.2.4. Capa reticular o esponjosa	62
3.2.5. Capa cristalina superficial	64
3.2.6. Cutícula externa	66
3.2.7. El sistema de poros	68
3.2.8. Variaciones fisiológicas en la ultraestructura de la cáscara	72
3.3. Efectos de los pesticidas en las aves silvestres	75
CAPÍTULO 4. MATERIAL Y METODOS	94
4.1. Área y población de estudio	95
4.2. Material estudiado	96
4.2.1. Material estudiado depositado en museos	97
4.2.2. Material obtenido en el periodo actual	100
4.3. Métodos de estudio y análisis	101
4.3.1. Examen patológico y necropsia de huevos	101
4.3.2. Morfometría	103
4.3.3. Análisis ultraestructural de la cáscara	104
4.3.4. Estudio de pesticidas	105
4.3.5. Análisis estadístico	106
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	107
5.1. Estudio de los huevos antiguos de Museos	108

5.1.1. Biometría de los huevos antiguos	108
5.1.2. Ultraestructura de la cáscara de los huevos antiguos	108
5.1.3. Morfometría ultraestructural de los huevos antiguos	116
5.2. Estudio de los huevos actuales	117
5.2.1. Residuos de pesticidas organoclorados y PCBs	117
5.2.2. Biometría de los huevos actuales	120
5.2.3. Ultraestructura de los huevos actuales	122
5.2.4. Fertilidad de los huevos actuales	133
5.2.5. Morfometría ultraestructural de los huevos actuales	136
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN	140
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	148
RESUMEN	152
SUMMARY	153
BIBLIOGRAFÍA	154
APENDICE I: Huevos de Quebrantahuesos depositados en museos.	169
APENDICE II: Etiquetas de los huevos del British Museum of Natural History.	172

CAPITULO 1. INTRODUCCION

El Quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) es un ave rodeada de leyenda. Nidificante en peñas inaccesibles y de aspecto peculiar, dio lugar en la antigüedad a multitud de leyendas y creencias entre las gentes sencillas. Durante siglos se le atribuían ataques al ganado e incluso al hombre y fue considerado un temido devorador de cabras y ovejas; no en vano, en los Alpes se le conocía como “*Lammergeier*”, buitre de los corderos.

El quebrantahuesos es un ave de presa de hábitos carroñeros que pertenece al orden de los falconiformes y a la familia de los accipítridos, y es el único representante del género *Gypaetus* en Europa. Junto con el buitre leonado, el buitre negro y el alimoche, forma el grupo de los grandes carroñeros alados que habitan la Península Ibérica. Su nombre científico *Gypaetus barbatus*, proviene de la palabra griega *Gyp* (buitre) y *Aetos* (águila) por tener semejanzas con ambas especies (Heredia, 1983). La segunda palabra, *barbatus*, hace referencia a la barba que adorna su cabeza y pico y que le caracteriza y diferencia de otros buitres.

Es un ave de gran tamaño, cuya envergadura puede alcanzar los 2,85 metros y su peso entre 5 y 7 kg. Este bajo peso en comparación con la envergadura, hace de él un volador incomparable, con gran facilidad para el planeo y el aprovechamiento de las corrientes térmicas que le permiten desplazarse con un mínimo esfuerzo. Pero quizás, la principal diferencia con otros buitres y con otros carroñeros es su especialización en el consumo de huesos, que constituyen su dieta principal. De esta forma, al ser osteófago, aprovecha lo que de los cadáveres dejan otros carroñeros. El nombre común castellano, quebrantahuesos, responde mucho mejor a los hábitos alimenticios de esta especie y hace referencia también a la costumbre de arrojarlos desde las alturas para romperlos.

Otra importante diferencia con otras especies de buitres es la utilización de baños de barro en aguas y suelos ferruginosos para adquirir la pigmentación de su plumaje. El Quebrantahuesos fue por ello también denominado cariñosamente “el pájaro de barro”. La coloración rojiza variable que presentan los ejemplares adultos como señal de estatus, dio pie durante décadas a diferentes hipótesis que explicaban su origen y funcionalidad.

Sometido a una implacable persecución directa e indirecta, el quebrantahuesos pasó en pocas décadas de ser un ave presente en la mayoría de los sistemas montañosos del continente europeo, incluida la Península Ibérica, a quedar relegada a las cumbres de los sectores central y occidental del Pirineo y a algunos ejemplares aislados en la Sierra de Cazorla. Tal fue la rapidez con que el Quebrantahuesos estaba desapareciendo y la avidez con que coleccionistas y cazadores querían cobrarla y conseguir sus huevos, que en agosto de 1958 se publicaba una disposición en el Boletín Oficial del Estado estableciendo una veda en toda España de cinco años de duración. A finales de los años setenta del pasado siglo, la población pirenaica se estimaba en unas treinta parejas (Heredia, 1991) y pudo recuperarse a partir de este núcleo residual –posiblemente algo mayor de lo estimado– hasta alcanzar los 117 territorios ocupados del año 2014 (Margalida et al., 2014).

La situación de la población pirenaica del Quebrantahuesos era una incógnita hasta finales de la década de los años 70, cuando se llevó a cabo el primer censo de la población reproductora (Heredia 1983). Entre 1975 y 1976, un equipo de Televisión Española dirigido por el inolvidable Félix Rodríguez de la Fuente, obtuvo las primeras imágenes de la vida íntima y del comportamiento del Quebrantahuesos, obtenidas en varios nidos y rompederos del Pirineo aragonés, imágenes que despertaron gran interés entre los científicos y dieron a conocer al gran público al pacífico buitre.

Pocos años después, en 1979, salía a la luz la Monografía de Hiraldo, Delibes y Calderón (Hiraldo et al., 1979) que constituyó, en palabras del gran naturalista y verdadero pionero de la conservación, José Antonio Valverde, el primer estudio sistemático universal realizado por ornitólogos españoles, y que recogió y sintetizó todo el conocimiento existente sobre la especie y sentó las bases científicas para futuros estudios.

Un año después de la desaparición del último Quebrantahuesos en las Sierras de Cazorla y Segura, en 1987, se creó el Servicio de Vida Silvestre en el seno del ICONA (Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza), que inició la realización de inventarios de especies amenazadas a nivel nacional, incluyendo el primer censo exhaustivo de Quebrantahuesos en los Pirineos y en el que se analizaba, además de la situación de la especie, la problemática de su conservación. Este primer censo fue la referencia para el seguimiento anual de la población que se realizó durante más de 20 años y sirvió de base para la elaboración, junto con las administraciones autonómicas, del *Plan Coordinado de Actuaciones para la Conservación del Quebrantahuesos*. Este documento ha servido durante años como modelo para las actividades y proyectos de conservación y el seguimiento de la especie. En su aplicación han intervenido el ICONA primero y el Ministerio de Medio Ambiente después, los Departamentos y Consejerías de Medio Ambiente de las Comunidades Autónomas, los Parques Nacionales, diversas ONG's, investigadores, guardería forestal y técnicos y profesionales especializados.

Con la aprobación de la Ley de Conservación de la Naturaleza (Ley 4/89) y la creación de los planes de recuperación se dotó al Quebrantahuesos y a otras especies amenazadas de una protección legal y el Quebrantahuesos obtuvo el compromiso pleno de las Comunidades Autónomas con su conservación. En 1991 vio la luz el *Plan de Recuperación del Quebrantahuesos* en Navarra, en 1994 en Cataluña y Aragón. En 1996 se sumó Andalucía al esfuerzo conservador, con la aprobación del *Proyecto de Reintroducción del Quebrantahuesos en Andalucía* y la puesta en marcha del Centro de Cría en Cautividad de Guadalentín, en el corazón del Parque Natural de Cazorla, Segura y las Villas. En 2002 nació el primer pollo en cautividad y en 2006, con la liberación de tres ejemplares volantones volvía a verse volar un Quebrantahuesos en las Sierras de Cazorla y Segura. Nueve años después, en 2015, tras la liberación de 31 ejemplares, ha nacido el primer pollo en libertad en esas sierras, hecho que no ocurría desde hacía más de 32 años.

En 2001 el Comité de Flora y Fauna aprueba la *Estrategia Nacional para la Conservación del Quebrantahuesos en España*, documento que recoge las líneas directrices de actuación futura. Dentro de estas actuaciones, las investigaciones realizadas entre 2000 y 2004 por el Grup d'Estudi i Protecció del Trencalós (GEPT) y su investigador principal, Antoni Margalida, han aportado valiosísima información sobre la biología

reproductora de la especie y han permitido documentar por primera vez aspectos desconocidos de su biología, información que puede ser crucial para futuras actuaciones encaminadas a la conservación de la especie. La publicación de la monografía de Margalida y Heredia en 2003 permitió dar a conocer la enorme cantidad de información y conocimientos que se habían adquirido en la última década, de forma que, en la actualidad sigue siendo la referencia obligada en el conocimiento de la especie.

El quebrantahuesos se ha beneficiado enormemente de varias medidas de gestión y conservación muy acertadas y del hecho de que algunas de ellas se mantuvieran de forma constante a lo largo de muchos años, algo bastante insólito en España. Pero, sobre todo se vio beneficiado del alto grado de consenso que existió hasta hace pocos años entre la administración central (ICONA y Ministerio de Medio Ambiente), las Comunidades Autónomas, ONG's, científicos, técnicos, guardería forestal, y la gran cantidad de voluntarios que participaban.

Sin duda, la actuación que ha resultado ser mas crucial y acertada en la recuperación de la especie en España fue la alimentación suplementaria, la instalación de comederos fijos y específicos para el Quebrantahuesos. El primer comedero empezó a funcionar en Lleida en 1981. Desde entonces, una extensa red de comederos repartidos por el Pirineo, sierras exteriores y áreas potenciales constituyeron el Programa de Alimentación Suplementaria. Esta medida fue clave para la recuperación de la especie, ya que garantizaba la supervivencia juvenil y preadulta. Es de destacar, otra vez, el enorme mérito que tiene haber garantizado –entre técnicos, guardas y Administraciones– que la mayoría de estos comederos hayan funcionado durante mas de tres décadas. Sobre todo cuando algunos de estos comederos eran y siguen operativos gracias al esfuerzo desinteresado de personas muy concretas y a las que rara vez se menciona.

La red de comederos dio como resultado una excepcional tasa de supervivencia preadulta, cifrada en un 66% de los ejemplares hasta los seis años de vida. Y es aquí donde reside el éxito de la alimentación suplementaria. Garantizar una tasa tan excepcionalmente alta en una especie como el quebrantahuesos supuso generar una reserva de individuos de enorme importancia demográfica, ya que permitía crecer a la población reproductora y cubrir las bajas que se producían entre los adultos, que sobradamente compensaba los efectos sobre la productividad de las parejas próximas. Una segunda función de los comederos fue que facilitaba la observación de ejemplares, la formación del personal, el asentamiento en nuevas áreas y la realización de los censos simultáneos, que se organizaban varias veces al año en ambas vertientes de la cordillera pirenaica y en los que intervenían guardas y técnicos de todas las Administraciones implicadas. Estos censos simultáneos permitían la realización de estimas del tamaño y estructura poblacional, es decir, no sólo permitían conocer con bastante exactitud el número de parejas reproductoras o que ocupan un territorio, sino también el contingente de individuos preadultos. Estos estudios revelaron que la fracción preadulta era tan importante numéricamente como la adulta y estaba constituida entonces por unos 200 individuos. Pero también pudimos conocer su evolución y, mientras las parejas reproductoras se incrementaban a razón de un 5% anual, la población preadulta lo hacía a un ritmo del 7 %.

También fue esencial el seguimiento de individuos mediante el radiomarcaje. Varias Administraciones públicas lo hicieron posible y, sobre todo, hay que destacar de nuevo el

mérito que tiene haberlo mantenido sin interrupciones durante décadas. Los primeros trabajos de radiomarcaje y seguimiento fueron abordados por el entonces Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza (ICONA) 1989, obteniendo los primeros datos sobre la dispersión juvenil y el uso del espacio. Los Gobiernos aragonés y catalán tomaron el testigo a partir de 1994, gracias al apoyo financiero de la Unión Europea a través de los fondos LIFE y del Ministerio de Medio Ambiente. Mucha de la información sobre demografía y, sobre todo, la mayor parte de la información sobre movimientos dispersivos y mortalidad, se obtuvo mediante el seguimiento radiotelemétrico de individuos.

Fue precisamente este radiomarcaje el que reveló la presencia de factores negativos que podrían cambiar radicalmente un escenario tan optimista en muy poco tiempo. Aunque algunos parámetros demográficos nos hacían ser optimistas, otros eran motivo de enorme preocupación para algunos técnicos y científicos. Al mismo tiempo que crecía la población reproductora se iba registrando una caída considerable del éxito reproductor y de la productividad de la especie, dos parámetros esenciales. Todo incremento de la población lleva aparejado una cierta caída en la productividad, ya que se incorporan ejemplares jóvenes sin la suficiente experiencia, pero el fracaso reproductor estaba siendo mayor de lo esperado para un crecimiento anual del 5% en el número de parejas reproductoras.

Por ello, en 1996 propuse a la entonces Diputación General de Aragón, que el Laboratorio Forense de Vida Silvestre, del cual era director e investigador principal, estudiara las causas por las que fracasaban algunas de las parejas reproductoras en Aragón. En algunos países el estudio de las causas del fracaso reproductor es una parte esencial del manejo de las especies amenazadas, por lo que propuse aplicar la metodología que se había seguido con el Cóndor de California (*Gymnogyps californianus*), el Águila calva (*Haliaeetus leucocephalus*), el Halcón peregrino (*Falco peregrinus*) o el Pigargo (*Haliaeetus albicilla*). Sin embargo, este estudio representaba un enorme reto por las especiales características de la nidificación y reproducción del Quebrantahuesos en el Pirineo.

El Quebrantahuesos emplaza los nidos en paredes rocosas, muchos de ellos están localizados en los Pirineos en altitudes superiores a los 2.000 mts y en los lugares mas inaccesibles y tranquilos. Tiene una especial predilección por las cuevas, grietas y repisas extraplomadas. La observación y el seguimiento de la reproducción es, por tanto, enormemente difícil. Si además unimos la especial fenología de la especie, en la que las fases más críticas de la reproducción tenían lugar en la época de mayor rigurosidad climática, el reto parecía inalcanzable.

En la mayoría de los casos de fracaso reproductor, la intervención del nido tenía lugar mucho tiempo después del fracaso. En primer lugar por un principio de precaución, ya que esta especie es especialmente sensible a las molestias, por lo que la constatación del fracaso en la reproducción conllevaba un elevado número de horas de observación. Por otro lado, muchas parejas mantenían la incubación un cierto tiempo después del fracaso, dificultando la recogida del material (Margalida y Bertran, 2006). Así, el único material que se podía recuperar del nido en la mayoría de los casos era, si había suerte, pequeños fragmentos de cáscara. Por ello, estos estudios debían explotar al máximo la información que podían facilitar estos pequeños fragmentos de cáscara recuperados.

Uno de los primeros pasos en este estudio fue la caracterización de la ultraestructura normal de la cáscara de huevo del Quebrantahuesos con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido. El uso masivo de pesticidas en agricultura en la mitad del siglo XX, en especial de pesticidas organoclorados, tuvo nefastas consecuencias en las poblaciones de aves silvestres, y, en concreto en las aves de presa, que se encontraban en lo más alto de la pirámide alimenticia. El efecto mas documentado de un pesticida organoclorado, en concreto del DDT y su principal metabolito, el DDE, es el provocado en el espesor de la cáscara de los huevos (Ratcliffe, 1970; Newton, 1973; Peakall y Cade, 1974; Burnett et al., 2013). Los derivados del DDT provocan una significativa disminución en el espesor de la cáscara de los huevos y alteraciones en la ultraestructura de la cáscara que alteran de forma significativa el intercambio gaseoso y provocan la muerte embrionaria (Newton, 1974; Kiff et al., 1979; Wiemeyer et al., 1984; Burnett et al., 2013).

Cuando iniciamos los estudios sobre las causas que estaban provocando problemas reproductivos en el Quebrantahuesos, no existía ninguna información sobre el grado de exposición de la especie a los pesticidas, ni si se habían producido cambios en la ultraestructura de la cáscara de los huevos. No sólo no había información sino que tampoco se conservaba ningún material adecuado para someterlo a análisis.

Por ello, el primer paso fue la búsqueda en las colecciones de los diversos museos de historia natural del mundo, de puestas y huevos de quebrantahuesos colectadas por naturalistas y coleccionistas antes del uso masivo de pesticidas. Así, se visitaron y consultaron las principales colecciones europeas, y obtuvimos muestras de cáscara de huevos colectados a finales del siglo XIX que nos permitieron estudiar y caracterizar la ultraestructura normal de la cáscara de los huevos de Quebrantahuesos.

Posteriormente, ya con huevos del periodo actual y con apoyo financiero del Gobierno de Aragón, el Ministerio de Medio Ambiente y la Generalitat de Cataluña, se fueron estudiando diversos aspectos de la ultraestructura, que permitían obtener valiosa información sobre el desarrollo de la reproducción. Así, se pudo desarrollar y estandarizar la metodología que permitía determinar datos tan trascendentales en el estudio del fracaso reproductor como era si todos los fragmentos intervenidos pertenecían al mismo huevo; si éste era de Quebrantahuesos o de otra especie; si el huevo al que pertenecía el fragmento era fértil o no; si había habido desarrollo embrionario y si éste había sido avanzado o no; o, en muchos de los casos, el orden de puesta. Así se concluyó que la fertilidad era elevada y no se correspondía con la que otras poblaciones de aves de presa expuestas y afectadas por los pesticidas organoclorados mostraban (Hernández 2005a). Además, la mayoría de los fallos en la reproducción se producían al final de la incubación en los momentos próximos o posteriores a la eclosión (Hernández, 2005a; Margalida et al., 2014).

Por otro lado, los análisis toxicológicos también indicaban que el grado de exposición a plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados (PCBs) era muy bajo (Hernández 2005b). En todos los huevos analizados, la carga de contaminantes organoclorados estaba muy por debajo de los niveles considerados como críticos para cada compuesto. Además, la concentración de estos mismos plaguicidas en cadáveres coincidía con la encontrada en los huevos. Definitivamente, el fracaso reproductor no tenía un origen toxicológico, así que no podía hablarse de infertilidad.

Tras estudiar un número significativo de puestas y huevos fallidos, en 2003 se concluyó que el problema no residía en la fertilidad sino en el fracaso reproductivo (Hernández 2003; Hernández 2005a). La diferencia, que puede parecer banal, era de enorme importancia para la conservación del quebrantahuesos, ya indicaba que los Quebrantahuesos no llevaban a término la reproducción debido a factores externos ajenos a ellos. Los resultados de los diferentes estudios llevados a cabo durante 10 años se plasmaron en los correspondientes capítulos de la Monografía de Margalida y Heredia.

Ese mismo año, en 2003, se advertía de la necesidad de diseñar nuevas estrategias de conservación, ya que el escenario estaba cambiando de forma rápida y brusca (Hernández, 2003). La paulatina caída de la productividad y del éxito reproductor en los Pirineos, y la investigación de las causas de los fracasos indicaba que todos los años se perdía una fracción considerable de la población adulta reproductora, y que se debía ser menos optimista al valorar los datos sobre demografía. La importante fracción preadulto (la llamada "población flotante", adultos sin territorio reproductor) estaba actuando como amortiguador en el mantenimiento de la población reproductora, pero los estudios demográficos demostraban que esta fracción se estaba agotando rápidamente (Antor, 2004).

Cuando una pareja perdía a uno de sus integrantes, en la mayoría de los casos era sustituido con inusitada rapidez. Muchos de estos cambios estaban pasando desapercibidos y lo único que se constataba es una súbita caída del éxito reproductor o, en ocasiones, un cambio en la ubicación del nido (Hernández, 2003). Se advertía también que, al tener el Quebrantahuesos una tardía edad de primera reproducción, los efectos de esta caída de la productividad y del éxito reproductor no se notarían hasta pasados unos años, cuando esta población flotante desapareciera y dejara de haber reclutamiento para incorporarse a la población reproductora. Tras varios años de baja productividad, el ritmo de crecimiento de la población adulta empezaría a disminuir con toda certeza, y, de mantenerse las tasas de mortalidad de entonces, lo predecible era un cambio de tendencia poblacional.

En 2008 un estudio publicado en la prestigiosa revista PLoS One (Oro et al, 2008) corroboró, mediante el modelado y la simulación demográfica, lo que ya había sido estimado un lustro antes. Para entonces, la productividad y el éxito reproductor en la vertiente española, no así en la francesa, llegaron a alcanzar niveles alarmantemente bajos, la población no volvió a mostrar tasas de crecimiento como las de los años 80 y 90, el número de parejas reproductoras prácticamente se había estancado, la fracción preadulto había casi desaparecido y el número de ejemplares encontrados muertos hasta entonces alcanzó cifras antes inimaginables (Margalida et al., 2008). De seguir la tendencia que mostraba entonces, existía una alta probabilidad de extinción de la especie en el Pirineo en los próximos 50 años (Margalida et al., 2014).

El efecto típico de la mortalidad por veneno era el que estábamos detectando en la población pirenaica de quebrantahuesos: afecta en mayor medida a la fracción adulta reproductora, pasa casi desapercibido y produce caídas tanto en la productividad como en el éxito reproductor (Hernández y Margalida, 2007; Hernández y Margalida, 2008). El peligro que supone la llegada del veneno a la población pirenaica ya fue advertido en reuniones de los Grupos de Trabajo de Ecotoxicología y del Quebrantahuesos. El auge del veneno en España hacía inexorable que tarde o temprano alcanzara el Pirineo. Un posterior estudio confirmaba también que la exposición al plomo estaba actuando como

una causa adicional de mortalidad entre los ejemplares adultos y seguía siendo un riesgo para la especie (Hernández y Margalida, 2008).

Así, puede resumirse la conservación del Quebrantahuesos en el Pirineo español en las últimas décadas, en tres escenarios diferentes: la recuperación de la especie en los años 80 y 90, con la colonización de nuevos territorios fuera y dentro de los Pirineos, expandiendo el área de distribución y la consolidación de la población con la existencia de una población preadulta tan importante como la adulta, y un alto grado de coordinación y colaboración entre las diferentes administraciones implicadas en su conservación; un segundo escenario con el aumento de la mortalidad adulta en los años 2.000 y la pérdida sistemática de ejemplares preadultos y reproductores con la consiguiente caída de la productividad y el éxito reproductor, la contracción del área de distribución y, finalmente, el descenso en el incremento anual del número de parejas reproductoras, con un estancamiento de la población.

Finalmente la situación actual del último lustro muestra un tercer escenario que se ha caracterizado por la ausencia de consenso y coordinación interautonómica para establecer medidas de conservación, la interrupción del seguimiento exhaustivo de la población reproductora en algunas áreas de su distribución, la ausencia de nuevos asentamientos, una población reproductora congelada, con todavía bajas tasas de productividad y éxito reproductor y la aparición de nuevas amenazas. Por un lado, la normativa sanitaria que obliga al cierre de muladares y comederos limita enormemente la cantidad y previsibilidad del alimento. Los planes de desmesurado desarrollo turístico especulativo en los Pirineos con el desarrollo de nuevas infraestructuras, en especial de accesos y construcciones, aumentarían las molestias y cambiarían de forma significativa el territorio. Por último, la proliferación de aerogeneradores, de enorme impacto sobre los buitres en otras regiones, también hace temer un futuro poco favorable para el Quebrantahuesos, íntimamente ligado a la ganadería y a los usos tradicionales, y tan ajeno al desarrollo industrial y turístico.

La reciente reproducción en libertad de la especie en el Parque Natural de Cazorla, Segura y las Villas y la positiva evolución de la población en la vertiente francesa de los Pirineos son dos rayos de esperanza que contrarrestan este oscuro panorama que parece dibujarse en la otrora boyante población de Quebrantahuesos de la vertiente sur de los Pirineos.

La presente tesis doctoral es una contribución al conocimiento de la ultraestructura de la cáscara de los huevos y de la biología de la reproducción del Quebrantahuesos, y de las aplicaciones que éste puede tener en el estudio de la biología y en la conservación de la especie en los Pirineos. Está basada en los trabajos que se llevaron a cabo entre 1996 y 2013, que tenían como objeto determinar las causas de las bajas tasas de productividad y éxito reproductor en la población pirenaica de Quebrantahuesos. La aplicación del estudio ultraestructural de la cáscara de los huevos nos ha permitido conocer con mayor exactitud las causas de la tendencia poblacional en cada periodo y nos aproxima con mayor nitidez al escenario actual en la vertiente sur de los Pirineos.

CAPITULO 2. BIOLOGIA DE LA CONSERVACIÓN DEL QUEBRANTAHUESOS EN ESPAÑA

2.1. Morfología y taxonomía del Quebrantahuesos.

El Quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) es una de las especies más amenazadas de Europa y se considera una especie "en peligro de extinción". Su delicada situación justifica que goce del máximo nivel de protección legal dentro de la UE y, así, tiene la máxima protección a nivel autonómico, nacional y europeo (DGCN 2000). Esta situación también motivó la puesta en marcha de proyectos de reintroducción en los Alpes (desde 1986) y, más recientemente en Andalucía (1996).

Las primeras descripciones del Quebrantahuesos se remontan al siglo XVIII y la primera denominación científica de la especie corresponde a Linneo en 1758, que lo incluyó en el mismo género que a otros buitres, recibiendo la denominación de *Vultur barbatus* (Margalida y García, 2003). Fue Storr quien, en 1874, dio el nombre actual del género, *Gypaetus*. Posteriormente, especímenes capturados en diferentes localizaciones fueron nombrados con diferentes apelativos genéricos. Las diferencias en el plumaje dieron pie, incluso, a la descripción de dos especies diferentes (Margalida y García, 2003).



Imagen 2.1: Quebrantahuesos adulto imperfecto fotografiado durante una captura en 2008 en el Pirineo de Lleida para la obtención de muestras de sangre en el estudio de la exposición al plomo.

El Quebrantahuesos pertenece al orden de los Falconiformes y a la familia de los Accipítridos, y es el único representante del género *Gypaetus* en Europa. Aunque en un principio se describieron hasta cinco subespecies, fueron Hiraldo et al., (1979) los que consideraron únicamente la existencia de dos únicas subespecies, criterio que permanece válido en la actualidad: *Gypaetus barbatus barbatus*, repartida por Europa y África del Norte, y *Gypaetus barbatus meridionalis*, distribuida en África meridional y oriental. Los ejemplares de la subespecie *meridionalis* son de menor tamaño que los de la subespecie *barbatus*.

El tamaño de los ejemplares adultos europeos es de 100-115 cm. de longitud total, una envergadura de 235-285 cm. y un peso de entre 5 y 7 kg. (Margalida y García, 2002). A diferencia de otros buitres, la cabeza del Quebrantahuesos está cubierta de plumas y la esclera presenta un color rojo muy llamativo cuya intensidad se incrementa con el estrés o la agresividad. Presenta una acumulación de cerdas en la base inferior del pico formando una "barba", a la que hace referencia su denominación. Presenta un antifaz negro y una mancha negra en la región auricular. El raquis de las plumas es blanco, lo que las diferencia de las plumas de otras grandes rapaces. Los tarsos están emplumados y la cola, de entre 45 y 53 cm. de longitud, tiene forma de cuña. La forma de las alas y la amplia cola le dan, en vuelo, un aspecto de cometa. El color del plumaje es muy variable en función de la edad y de la impregnación con barros ferruginosos.

Como en otras Falconiformes, el Quebrantahuesos presenta dimorfismo sexual inverso, es decir, las hembras son de mayor tamaño que los machos. Existen notables diferencias en el plumaje de los ejemplares juveniles y de los adultos y atraviesa varias fases de coloración del plumaje hasta llegar a la librea adulta definitiva. Existe una correspondencia entre las peculiaridades del plumaje y la edad del individuo y existen diferencias ligadas al sexo, alcanzando las hembras la librea adulta mas prematuramente que los machos (Margalida y García, 2002). Así, los individuos se reparten en seis clases de edad (Heredia y Margalida 2005a):

1) juvenil de primer año, que no presenta muda, con cabeza y cuello negros, iris oscuro, barba pequeña, un escudo blanco muy visible en forma de "V" en la espalda y plumaje del pecho, vientre y calzas marrones, moteados de claro;

2) Joven de segundo año, con algunas rémiges primarias internas mudadas, presenta la cabeza y el cuello negros que contrastan con el pecho marrón, formando una capucha y el moteado del pecho y calzas ya difuminado;

3) Inmaduro de tercer año, en el que la silueta tiene un borde irregular en las alas debido a la muda y diferente crecimiento de las rémiges secundarias, mantienen el cuello negros contrastando con el pecho marrón, la espalda ya no presenta escudo y las plumas cobertoras son mas claras que las rémiges y están salpicadas de plumas blancas que le dan un aspecto abigarrado;

4) Subadulto de cuarto año, de silueta muy similar a la de un adulto, con rémiges primarias mudando, plumas de la cara blancas con desaparición progresiva de las plumas negras de la cabeza, aunque se mantienen en el cuello;

5) Adulto imperfecto de quinto y sexto año, con plumaje abigarrado por la mezcla de plumas marrones y blancas, presentando todavía plumas negras en vientre y cuello, mezcla de plumas marrones y pizarra del adulto en las alas y cabeza blanca, y,

6) Adulto, de siete o mas años, con silueta esbelta, alas estrechas y cola larga, cabeza, pecho y vientre variando del blanco al naranja, un fino collar en la

entrada del pecho mas o menos cerrado, espalda gris pizarra o negra y rémiges grises contrastando con las cobertoras negras, con borde oscuro.

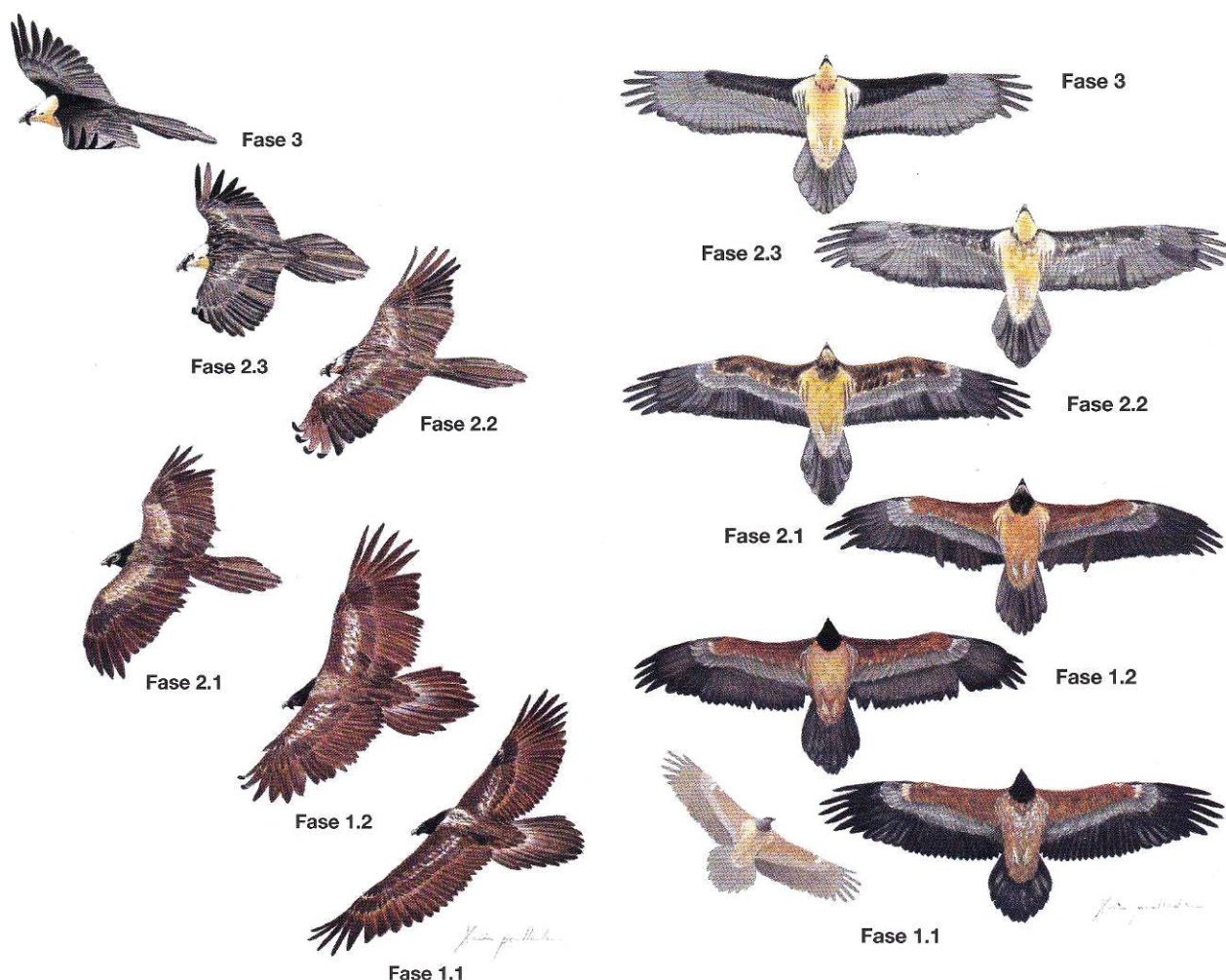


Imagen 2.2: Fases del plumaje del Quebrantahuesos en función de la edad establecidas en Heredia y Heredia (1991). Imágenes de Xavier Perellada, tomada de Margalida y García (2002) con autorización.

2.2. Coloración del Plumaje en el Quebrantahuesos

Sin duda, una de las particularidades etológicas que diferencian al Quebrantahuesos de otros buitres y otras Falconiformes es que utilizan baños cosméticos en aguas y barros ferruginosos para pigmentar el plumaje (Margalida 2000b). De hecho, la existencia de ejemplares totalmente blancos motivó la descripción de una nueva subespecie, *Gypaetus barbatus albicans* (Margalida y García, 2002). Durante muchas décadas se formularon varias hipótesis sobre las diferencias en la intensidad de la coloración de los ejemplares

adultos (Negro et al., 1999a; Margalida 2000a; Negro y Margalida, 2000). En un principio se consideró que la pigmentación se adquiría de forma accidental (Brown y Bruton, 1991) tras demostrarse que la coloración no era debida a un pigmento carotenode (Berthold, 1967) sino a la adhesión de partículas de hierro al plumaje que le daban el característico color anaranjado (Brown y Bruton, 1991). Fueron Frey y Roth (1994) los que demostraron no sólo que la coloración se adquiría de forma deliberada en ejemplares cautivos si se les facilitaba balsas de agua con arcillas rojizas, sino también que seleccionaban siempre estas aguas ferruginosas en detrimento de las balsas de agua sin barro. La primera observación de este comportamiento en libertad (Caussi Imont et al., 1995) y tres años mas tarde Margalida y Pelayo (1998) demostraron que las utilizaban asiduamente y además que la utilizaban tanto adultos como ejemplares jóvenes, donde el color oscuro del plumaje enmascaraba los tonos anaranjado adquiridos (Brown y Bruton, 1991).

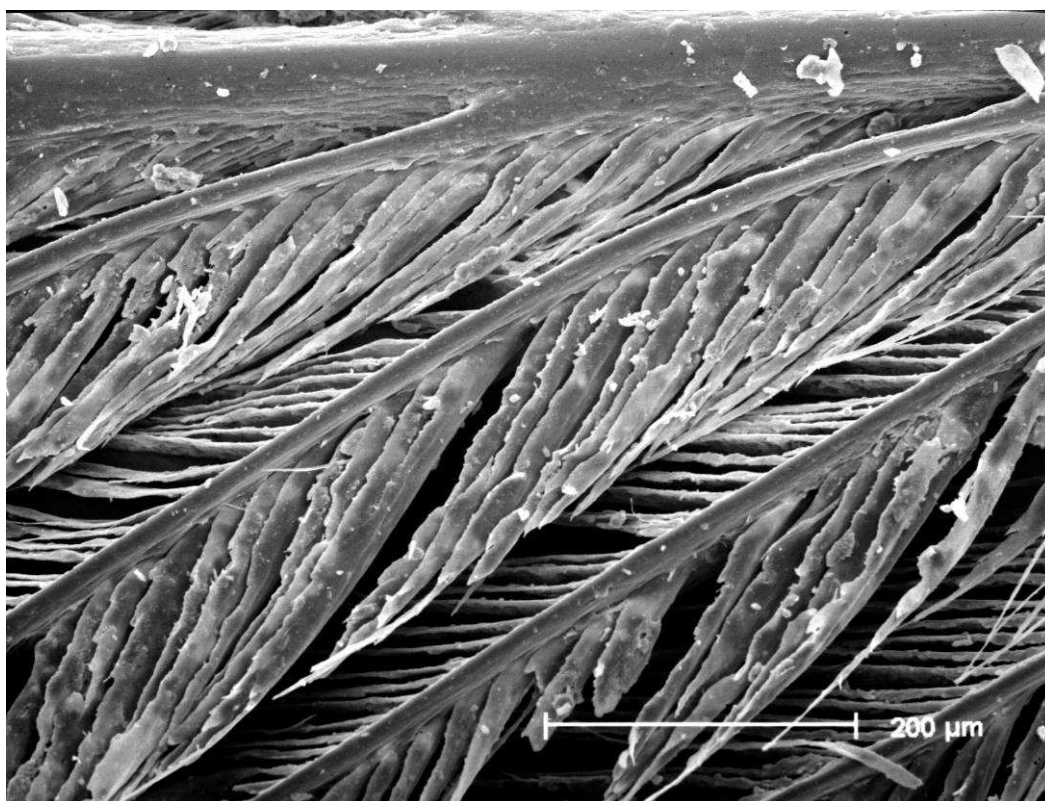


Imagen 2.3: Fotografía de las barbas de una pluma de Quebrantahuesos de Lleida vista mediante un microscopio electrónico de barrido en la que se aprecia la impregnación de barro de las bárbulas formando los característicos abultamientos.

Una vez resuelto el enigma del origen de la coloración sólo, quedaba encontrar una explicación a la funcionalidad de la adquisición deliberada de cosméticos. Tras ser planteadas numerosas hipótesis (Brown y Burton, 1991; Frey y Roth, 1994; Negro et al., 1999; Arlettaz, et al. 2002; Negro et al., 2002), explicaciones como una respuesta adaptativa, el camuflaje, la defensa frente a ectoparásitos o la protección del propio plumaje han quedado definitivamente descartadas. En la actualidad es ampliamente aceptado que la coloración rojiza es una señal de estatus en los enfrentamientos intraespecíficos (Margalida y García, 2002), de forma que los individuos dominantes y mas intensamente coloreados se beneficiarían de su señal de estatus y podrían, así, reducir el número de respuestas agresivas para mantener la dominancia o para facilitar la prioridad

de acceso a los recursos. Además, se ha encontrado que las hembras presentan coloraciones mas intensas (Beltrán y Margalida, 1999) y en el Quebrantahuesos existe un dimorfismo sexual inverso, como en otras Falconiformes, de forma que las hembras son ligeramente mas grandes que los machos y presentan también un comportamiento mas dominante (Margalida y Pelayo, 1998).

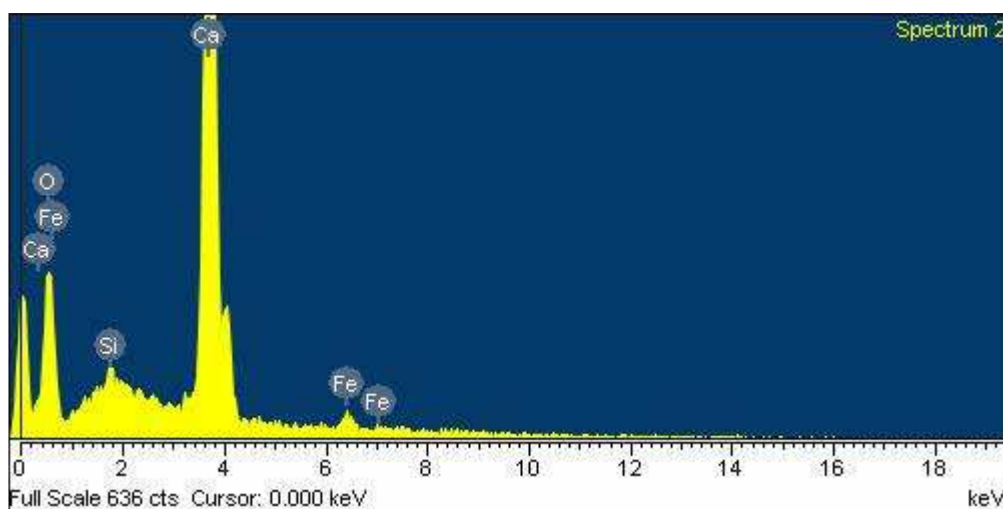


Imagen 2.4: Composición semicuantativa mediante EDDAX del material adherido a una pluma anaranjada de un ejemplar adulto de Lleida –Imagen 2.3-. El material que proporciona el color está formado por óxido de hierro principalmente y algunos restos de arcillas (silicatos) que han sido lavadas.

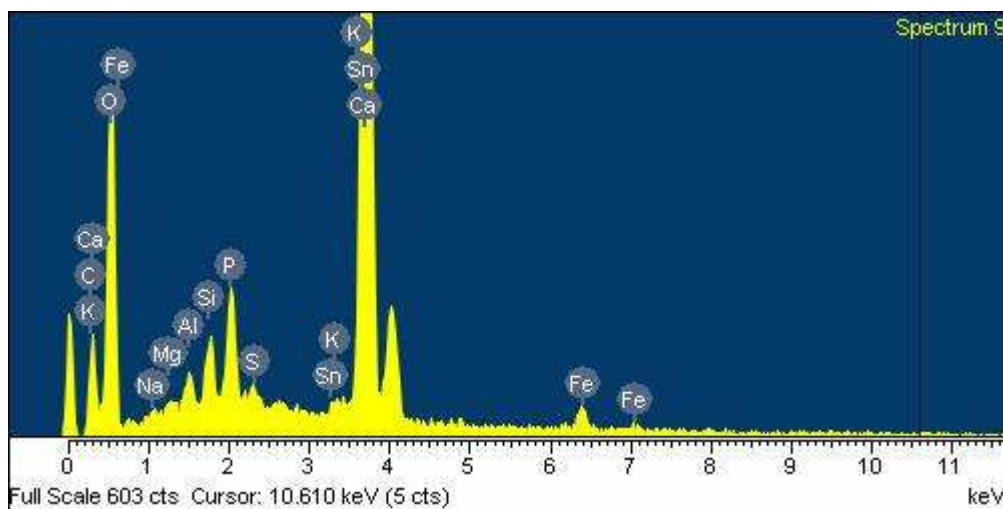


Imagen 2.5: Composición semicuantativa mediante EDDAX del material adherido a una pluma anaranjada de un ejemplar adulto de Huesca en la que encontramos además del óxido de hierro, mayor cantidad de restos de arcillas (silicatos de aluminio y magnesio) y restos orgánicos (presencia de P, K, Na y Cl).

Los colores rojos son muy frecuentes en el mundo de las aves y normalmente son debidos a la presencia de pigmentos carotenoides, que al ser esenciales deben ser obtenidos a través del alimento (Negro et al., 2002). El Quebrantahuesos, al alimentarse mayoritariamente de huesos de ungulados, muy pobres o de nulo contenido en

carotenoides, ha tenido que adquirir las tonalidades rojizas mediante otros mecanismos (Margalida y García 2002). Así, el anillo esclerótico rojo se consigue a través de una mayor perfusión sanguínea, por lo que el color se hace mas intenso si aumenta el flujo sanguíneo en situaciones de estrés. Además, las fuentes de aguas ferruginosas son escasas y muy localizadas, por lo que pueden determinar de forma decisiva la calidad de un determinado territorio y hacer que solamente determinados individuos con excelente condición y perfecto conocimiento del territorio tengan acceso a ellas (Margalida y Pelayo, 1998).

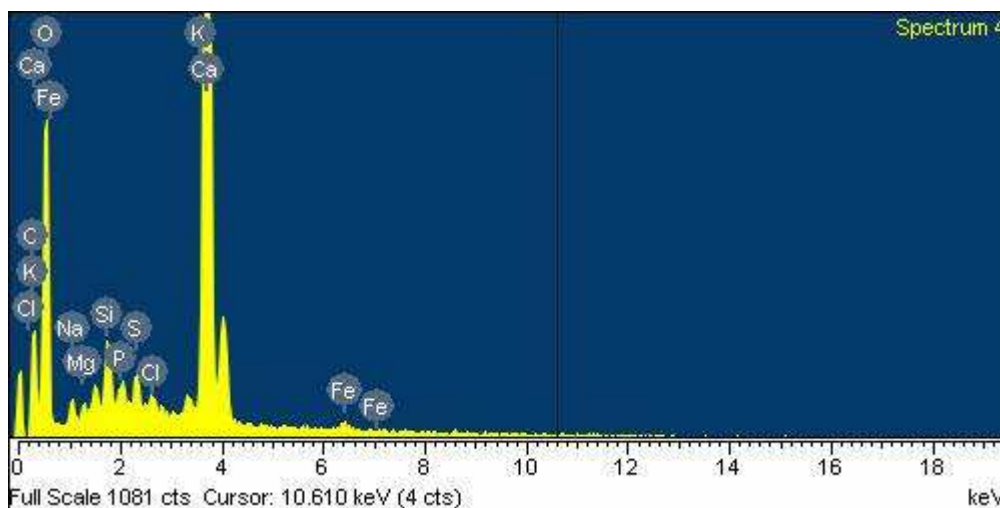


Imagen 2.6: Composición semicuantativa mediante EDDAX del material adherido a una pluma anaranjada de un ejemplar adulto de Navarra en la que encontramos además del óxido de hierro, restos de arcillas de composición muy similar al ejemplar de Huesca y Lleida.

De hecho, ejemplares de diferentes territorios muestran diferentes coloraciones del plumaje y del material que impregna las plumas en las diversas regiones. Aunque pueda existir una diferente composición de los suelos en las diferentes áreas de distribución del Quebrantahuesos y se puedan detectar diferencias en cuanto a la composición de los barros cosméticos, el material que impregna las plumas muestra una composición extraordinariamente constante entre individuos de diferentes regiones (Imágenes 2.4, 2.5 y 2.6).

2.3. Dieta y Alimentación

Otra importante característica que diferencia al Quebrantahuesos de otras especies de buitres es su dieta (Margalida et al., 2009). El Quebrantahuesos es una especie necrófaga especializada en el consumo de huesos de cadáveres de mamíferos. Además, cuando los huesos son demasiado grandes para ser ingeridos, utiliza superficies rocosas, los llamados rompederos, para romperlos arrojándolos desde las alturas. A pesar de que la base de la dieta son fundamentalmente los huesos, existen notables diferencias entre la alimentación de los adultos en el periodo reproductor y el resto del año, así como en las distintas fases del desarrollo de los pollos (Margalida y Bertran, 1997; Margalida et al., 2001).

Dentro de la especialización trófica del Quebrantahuesos, la dieta está integrada fundamentalmente por restos óseos de ungulados domésticos y salvajes (Hiraldo et al., 1979; Heredia, 1983). Por ello está muy ligado a la ganadería y usos tradicionales y se ha adaptado perfectamente a los cambios espaciales y temporales en la disponibilidad de alimento (Heredia, 1991). El Quebrantahuesos descarta los huesos de vacuno, equino o porcino, si dispone de restos de especies mas pequeñas, porque el mayor tamaño de los huesos suponen una mayor inversión energética para su traslado y una mayor dificultad para su fraccionamiento, incluso con el empleo de rompederos (Heredia, 1991).



Imagen 2.7: Radiografía ventrodorsal de un Quebrantahuesos tras la ingestión de una tibia de ovino y otro hueso grande. En el ventrículo se aprecia la presencia de numerosos restos de pezuñas de ovino/caprino.

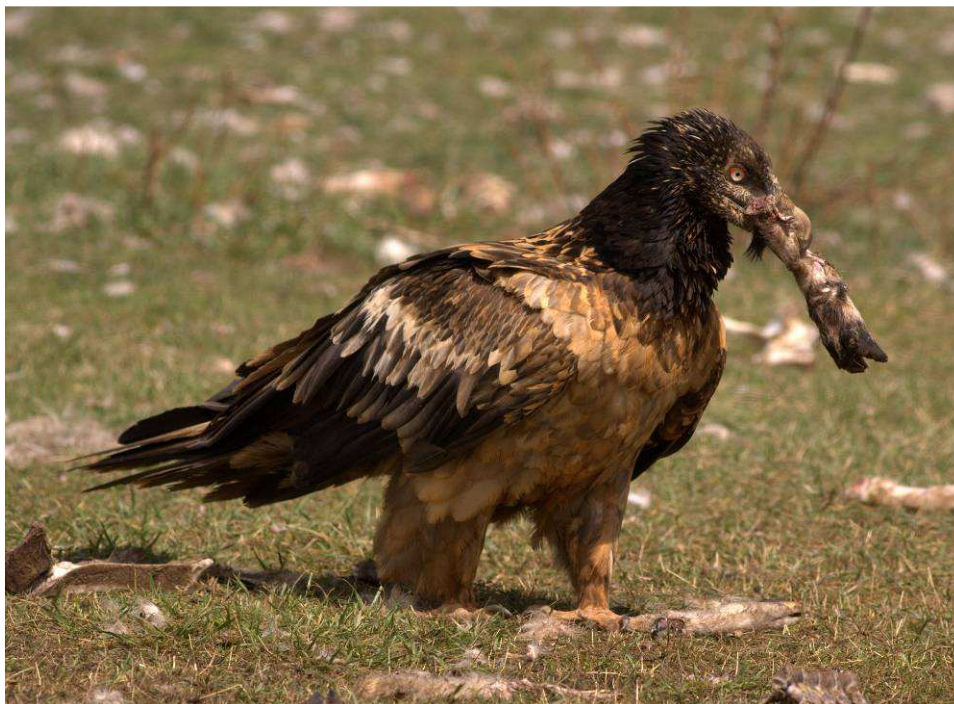


Imagen 2.8: *Inmaduro de 3 años ingiriendo una pata de ovino en un punto de alimentación suplementaria.*

Diversos autores han demostrado que los animales domésticos son una parte muy importante en la dieta del Quebrantahuesos (Hiraldo et al., 1979; Margalida y García 2002). Sin embargo, existen también diferencias espaciales en la dieta de las diferentes subpoblaciones condicionadas por la disponibilidad de recursos (Heredia, 1991). Así, en las parejas pirenaicas (del Pirineo axial) la proporción de ungulados salvajes es mayor dentro de la dieta ya que la menor previsibilidad del alimento acentúa el carácter oportunista de la especie (Hiraldo et al., 1979). Los recursos tróficos explotados por una pareja de Quebrantahuesos están condicionados por la facilidad y previsibilidad para obtenerlos, pero también a su contribución energética (biomasa de la presa), dando como resultado diferencias en la alimentación durante la reproducción (Margalida y Bertran, 1997; Margalida y Bertran 2001).

Varios autores han señalado también la enorme importancia de la presencia y mantenimiento de muladares durante la estación reproductora (Heredia, 1991; Donázar, 1992; Margalida et al., 1997a) ya que se ha demostrado que el efecto en el éxito reproductor de algunas parejas es muy superior al estimado, y por lo tanto resultan trascendentes en la conservación de la especie (Heredia, 1991).

Tal y como se ha comentado, la dieta del Quebrantahuesos se basa en los cadáveres de ungulados domésticos y salvajes de tamaño medio (Hiraldo et al., 1979; Margalida et al., 1997a) y seleccionan con preferencia huesos largos. La posibilidad de ingestión de huesos de gran tamaño se resuelve con la utilización de los rompederos, zonas rocosas (normalmente morrenas) donde el Quebrantahuesos deja caer desde el aire de forma deliberada y repetida los grandes huesos para fragmentarlos (Margalida y García, 2003). Suelen estar ubicados en zonas expuestas al viento y con pendiente, de forma que se

facilite que el ave pueda remontar sin excesivo esfuerzo y que los restos reboten tras la caída para su fragmentación (Margalida y García, 2003).

Aunque el uso de los rompederos es ocasional, cobran una especial importancia en la época de cría para la preparación de la comida del pollo, sobre todo durante sus primeras semanas de vida (Heredia, 1991; Margalida y Bertran, 1997). De esta forma, cada pareja dispone de rompederos en las proximidades de los nidos. Además, estos lugares sirven también como lugar de almacenamiento (Margalida y García, 2002).



Imagen 2.9: *Aportes a un nido de Quebrantahuesos de la Jacetania oscense próximo a un punto de alimentación suplementaria en el que los restos de porcino eran el principal aporte.*

Margalida y Bertran (1997) y Margalida et al. (2005) encontraron que la dieta del pollo durante las primeras semanas de vida difería de forma significativa de la dieta de los adultos, siendo los aportes al nido formados en una elevada proporción de restos cárnica en detrimento de restos óseos. Así, durante la cría, aunque el pollo ingiere también pequeños fragmentos de hueso de pequeños ungulados, el alimento con mayor proporción cárnica (pequeños mamíferos, reptiles, aves) cobra especial relevancia (Margalida et al., 2005).

Los restos óseos de vacuno, equino y porcino aparecen de forma esporádica y dependen enormemente de su disponibilidad y de la abundancia de los restos óseos de ovino, caprino y pequeños ungulados silvestres, que son los huesos preferidos por su tamaño. Así, cuando los últimos escasean, el Quebrantahuesos es capaz de explotar huesos de mayor tamaño, mostrando así un claro carácter oportunista (Hiraldo et al., 1979).

Además, parece ser que el Quebrantahuesos selecciona huesos de mas de tres semanas de antigüedad (Brown y Plug, 1990), de forma que ya han perdido cierta cantidad de agua, lo que facilita la digestión (Margalida y García, 2002). Esta estrategia le permite almacenar el alimento cuando los recursos son mas abundantes, ya que los huesos se conservan aptos para su consumo durante largo tiempo (Margalida y García, 2002). Los posaderos, los rompederos y los nidos son los lugares habituales para guardar los excedentes de alimento (Margalida y Bertran, 2001). En este sentido, la proximidad al nido facilitaría la defensa de estas “despensas” frente al parasitismo por conespecíficos o por otras especies (Margalida y Bertran, 2003; Margalida y Bertran, 2005).



Imagen 2.10: Joven de dos años cargando con un espinazo de ovino para fragmentarlo o desarticularlo en un rompedero arrojándolo desde la altura (Foto J. Bas).



Imagen 2.11: Restos óseos antiguos de ovino/caprino fragmentados en un rompedero.



Imagen 2.12: *Muladar tradicional en el Somontano oscense donde se abandonaban los cadáveres de animales domésticos.*



Imagen 2.13: *Punto de Alimentación Suplementaria específico para el Quebrantahuesos. Al utilizar patas, espinazos y huesos como aporte se limita la utilización por parte del Buitre leonado y la competencia trófica con el Quebrantahuesos.*

2.4. Biología de la Reproducción

El Quebrantahuesos emplaza los nidos en paredes rocosas, muchos de ellos están localizados en los Pirineos en altitudes superiores a los 2.000 mts y en los lugares mas inaccesibles y tranquilos. Tiene una especial predilección por las cuevas, grietas y repisas extraplomadas. Su presencia está muy ligada a áreas de montaña, donde encuentra cantiles que utiliza como hábitat de nidificación, con presencia de ungulados domésticos y salvajes, presencia de pedregales o morrenas como lugares apropiados para la preparación del alimento (rompederos) y con vientos orográficos que le permitan explotar las grandes extensiones del territorio que constituyen sus áreas de campeo. No hace mucho tiempo, el Quebrantahuesos era una especie habitual en todas las grandes zonas montañosas de la Península Ibérica que reunían estas características (Hiraldo et al., 1979).

El Quebrantahuesos es una especie sedentaria, territorial y monógama con escaso dimorfismo sexual y con roles parentales durante la cría muy similares (Margalida y García, 2002). A pesar de ser una especie monógama, en los Pirineos se ha encontrado una fracción considerable de territorios con tríos poliándricos (Heredia, 1991), con un tercer adulto que coopera en las labores reproductivas con una pareja (Margalida et al., 1997). Presenta un dilatado ciclo reproductor donde cría un único pollo con éxito cada año, así como un largo periodo de dependencia juvenil (Heredia, 1991). El reparto equitativo de las labores entre ambos sexos en la cría es debido a la necesidad de grandes desplazamientos que deben realizar para la búsqueda de alimento, así como por la imposibilidad para un solo individuo de obtener suficiente alimento para aportar al nido. El área de campeo de cada pareja varía enormemente, pero pueden llegar a superficies de 700 km² y con desplazamientos diarios que con frecuencia sobrepasan los 20 km (Margalida y García, 2002).

Es un buitre territorial y cada pareja dispone dentro de su territorio de varios nidos (entre 3 y 5 nidos activos por territorio) que van utilizando rotativamente a lo largo de los años, siendo mas numerosos cuanto mas antigua es la pareja (Margalida et al., 2003). Las cuevas, cornisas extraplomadas o grietas son lugares habituales para el emplazamiento de los nidos, con orientaciones preferentes al S y al E. Los nidos están formados por grandes plataformas de ramas secas forrados en el interior con ramas frescas, hierba, musgo e incluso lana (Margalida y Bertran, 1997). Los nidos son usurpados principalmente por el Buitre leonado (*Gyps fulvus*), aunque otras especies (Cuervo –*Corvus corax*–, Alimoche –*Neophron percnopterus*–, Halcón peregrino –*Falco peregrinus*–) pueden ocupar también nidos activos de Quebrantahuesos (Margalida y Bertran, 2005).

El ciclo reproductor es largo (180 días desde la puesta hasta que el pollo abandona el nido, permaneciendo una media de 123 días), junto con el periodo de construcción del nido, que puede durar hasta 110 días y un largo periodo de dependencia juvenil que llega hasta los dos meses (Margalida y Bertran, 2000), hacen que prácticamente todo el año el Quebrantahuesos está dedicado a la reproducción (Sunyer, 1991; Heredia, 1991) y que las puestas tenga lugar en pleno periodo invernal (Margalida y García, 2002). Las puestas son normalmente dobles y tiene lugar mayoritariamente entre la segunda quincena de diciembre y la primera de febrero, mostrando cada pareja muy poca variación interanual en la fecha de puesta (Margalida y Bertran, 2000). En el caso de las puestas dobles, la asincronía entre ambos huevos es de 3 a 5 días (Margalida et al., 2004). Las puestas

dobles son mas habituales, aunque solamente sobrevive uno de los pollos (Margalida y García, 2002). Las puestas simples son mas frecuentes en hembras noveles o de elevada edad (Frey et al., 1995). La reducción de la pollada se produce por fraticidio, donde el pollo mayor mata al menor a los pocos días de vida, fenómeno conocido como *cainismo* (Margalida et al., 2003; Margalida et al., 2004). Se ha interpretado la existencia del segundo huevo como un huevo de sustitución o de seguridad, dado que la estrategia reproductora del Quebrantahuesos no permite las puestas de sustitución (Hiraldo et al., 1979).



Imagen 2.14: Hábitat de la especie en el Alto Pirineo.

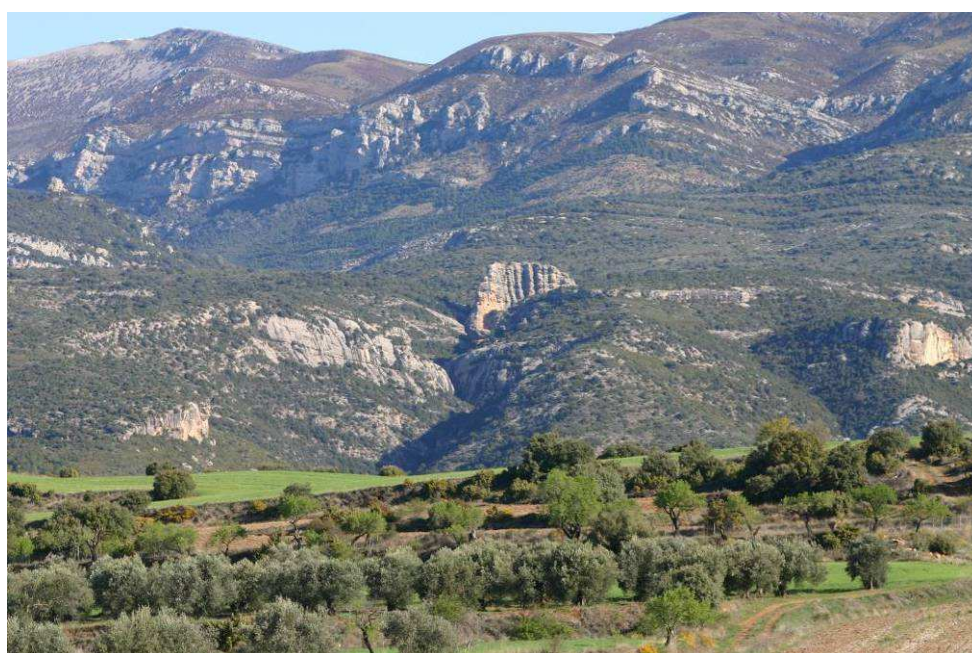


Imagen 2.15: Hábitat de la especie en el Prepirineo (Sierra de Guara).

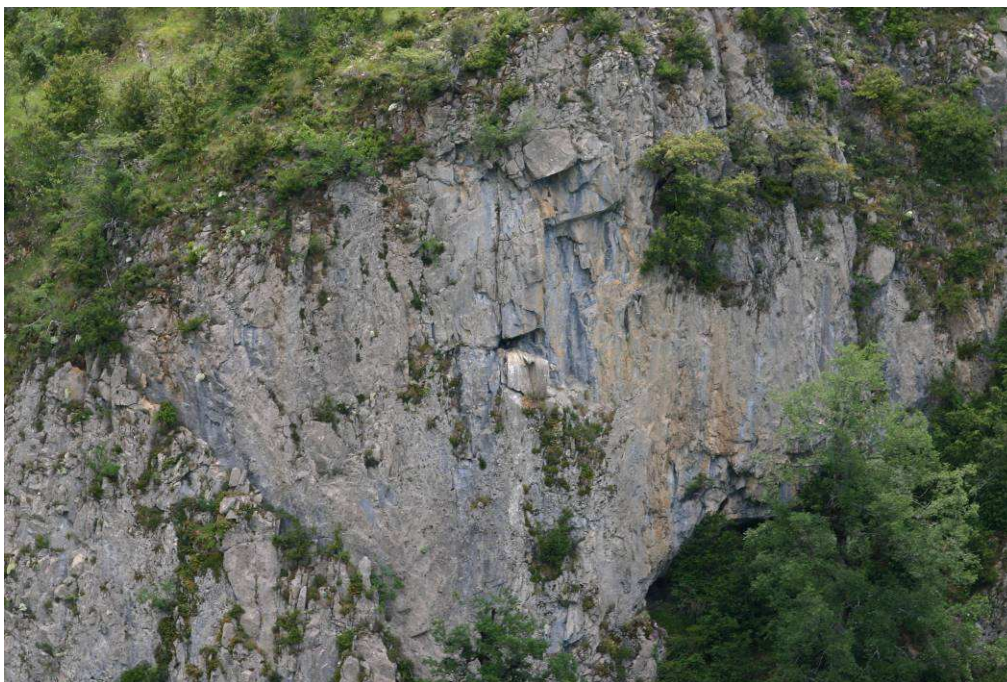


Imagen 2.16: *Nido de Quebrantahuesos en el Pirineo navarro. Cada pareja tiene entre 3 y 5 nidos que utiliza rotativamente en diferentes años.*



Imagen 2.17: *Plataforma de un nido de Quebrantahuesos en el Pirineo oscense una vez finalizada la crianza del pollo (Foto P. Barrachina).*

La longitud y anchuras medias de los huevos son de 83 X 66 mm, respectivamente. La coloración es bastante variable, desde el blanco marfil al naranja intenso. Algunos huevos se impregnan con el plumaje de los adultos durante la incubación, llegando incluso a manchar de arcilla al manipularlos. Otros, sin embargo, permanecen muy poco teñidos durante la incubación.



Imagen 2.18: Huevo de puesta única procedente de un nido de la provincia de Lleida, retirado tras el fracaso en 2006 que presenta coloración de la cutícula y escasa impregnación de arcillas.

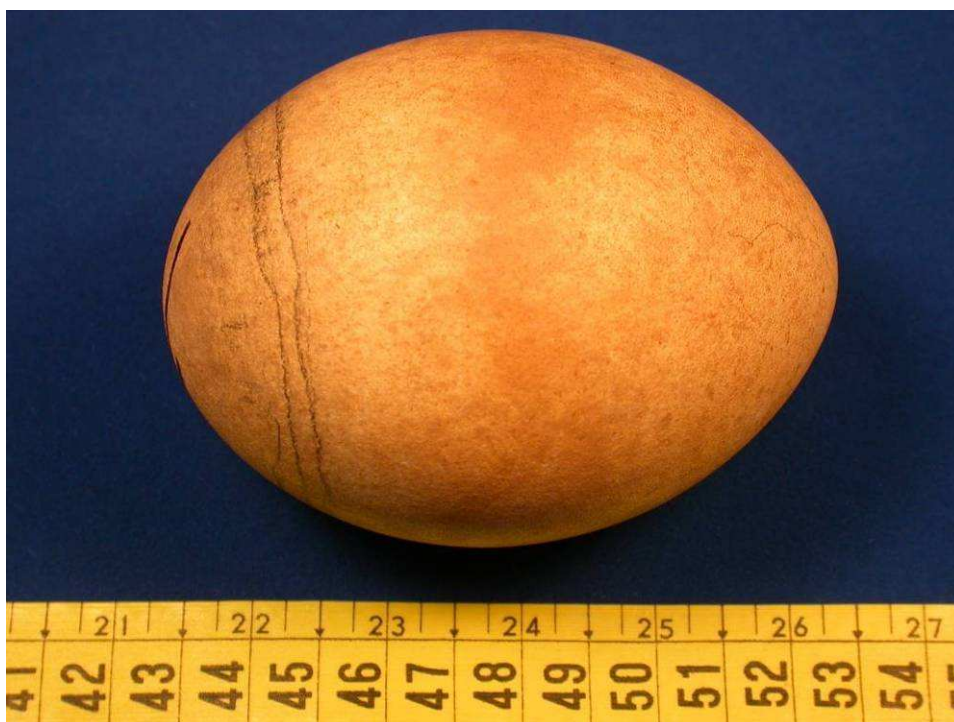


Imagen 2.19: Huevo de puesta única procedente de un nido de la provincia de Huesca, retirado tras el fracaso en 2003, que presenta marcada coloración por la impregnación de arcillas.

No todos los huevos que presentan color están impregnados de barro por el contacto con el plumaje. Algunos huevos tienen color marrón o anaranjado por la pigmentación de la cutícula externa mas que por la impregnación con arcillas. En las puestas dobles, en ocasiones hay diferencias de coloración entre los huevos que permanecen a lo largo de toda la incubación. En los pocos casos que se ha podido documentar, es el segundo huevo el que es mas claro o menos pigmentado.



Imagen 2.20: Puesta doble procedente de un nido de la provincia de Huesca retirada en 1992 para investigar las causas del fracaso. Por el desarrollo embrionario se determinó que el segundo huevo era el mas claro.

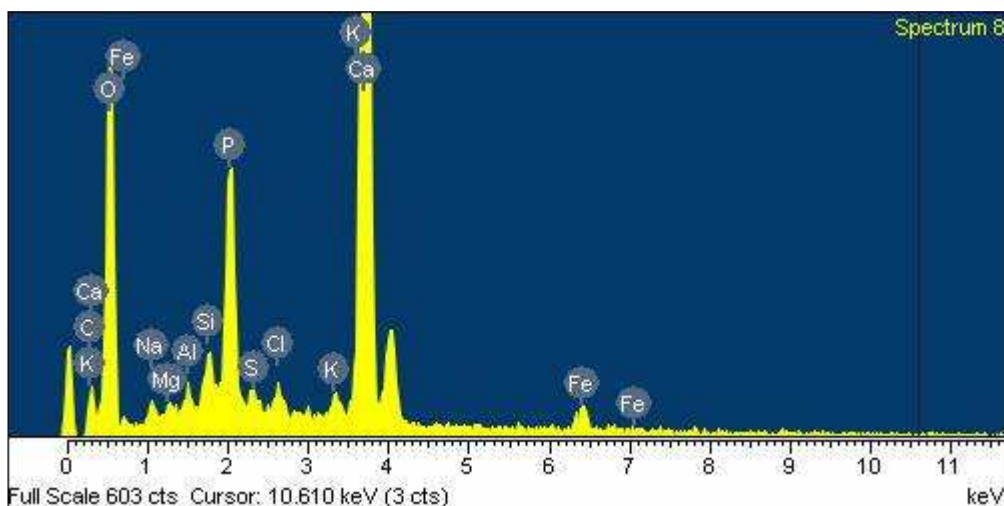


Imagen 2.21: Composición semicuantativa mediante EDDAX del barro que impregnaba un huevo de Quebrantahuesos de la provincia de Lleida retirado en 2003 en el que se aprecia una concordancia con la composición del barro que impregna las plumas.

Como consecuencia del dilatado periodo reproductor, las puestas tienen lugar en pleno periodo invernal, el 80% de ellas entre el 21 de diciembre y el 20 de enero (Margalida et al., 2005). Sólo se han descrito dos puestas de sustitución en los Pirineos (Margalida et al., 2001; Margalida y Bertran, 2002). Existe muy poca variabilidad interanual en las fechas de puesta dentro de cada pareja (Margalida et al., 2003). El tiempo medio de incubación es de 53-55 días, tanto en libertad como en cautividad (Margalida et al., 2005). En casos de huevos infértiles o de muerte embrionaria se han descrito incubaciones prolongadas de hasta 29 días mas del tiempo medio de incubación (Margalida y Bertran, 2004).

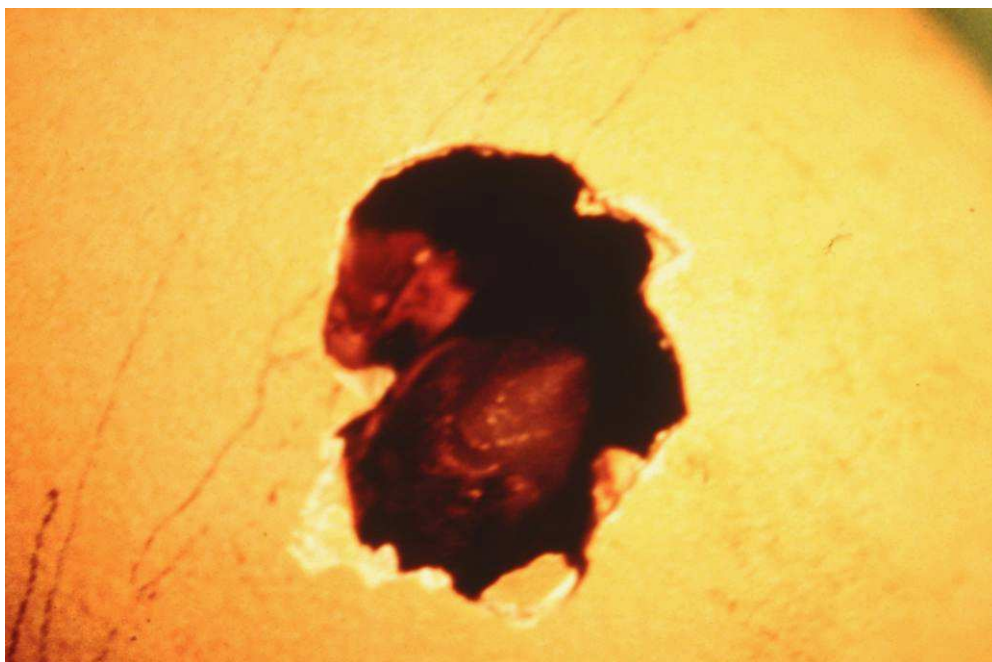


Imagen 2.22: *Momento del nacimiento de un pollo de Quebrantahuesos en cautividad, a partir de una puesta rescatada en Huesca en 1995 tras la incubación artificial.*

La asincronía de eclosión en el caso de puestas dobles es de 6.5 ± 0.96 (rango 5-8, $n = 6$), y la reducción de la pollada se produce como consecuencia de la agresión fraticida y la muerte por inanición del segundo pollo (Margalida et al., 2004), no llegando a vivir mas de 4-8 días. La dieta del pollo durante el primer mes de vida difiere de forma significativa de la dieta de los adultos, estando formados los aportes al nido, en una elevada proporción de restos cárnicos, en detrimento de restos óseos y seleccionando los adultos durante el campeo presas de pequeño tamaño (aves, reptiles y pequeños mamíferos) con mayor proporción de tejidos blandos (Margalida et al., 2005).

La incubación y la crianza del pollo corre a cargo de ambos progenitores y se reparten las tareas de la cría de forma equitativa, prolongándose la permanencia del pollo en el nido una media de 120.9 ± 6.5 días (rango 106-133, $n = 61$), es decir, una media de cuatro meses (Margalida et al., 2005). Durante el primer mes de vida el pollo es atendido continuamente durante todo el día, ya que las bajas temperaturas y la predación son sus principales amenazas y condicionan la presencia permanente de un adulto en el nido (Margalida et al., 2003). A partir de los tres meses de vida, ambos adultos dedican menos tiempo al pollo y se centran mas en la búsqueda de alimento.

Tras cuatro meses de estancia en el nido, el pollo depende de los progenitores al menos durante los dos meses posteriores al primer vuelo, llegando incluso a mantener una dependencia de éstos de hasta cinco meses después de abandonado el nido (Sunyer, 1991). En este periodo los rompederos cumplen una importante labor como lugar de alimentación y aprendizaje (Heredia, 1991). Conforme se aproxima un nuevo ciclo reproductivo, la agresividad de los adultos aumenta forzando al pollo a iniciar la dispersión juvenil (Heredia, 1991), una de las etapas mas críticas para la especie.



Imagen 2.23: *Ceba de un pollo de Quebrantahuesos de 1 día de edad criado en cautividad. La dieta del pollo durante las primeras semanas difiere enormemente de la dieta de los adultos, con mayor presencia de presas pequeñas y mayor proporción de tejidos blandos y restos cárnicos.*

Los estudios de radiomarcaje y seguimiento de los jóvenes durante la dispersión juvenil han mostrado una alta dependencia de los puntos de alimentación suplementaria (Carrete et al., 2006). Así, la utilización del espacio pirenaico por parte de los jóvenes y los preadultos tiene un marcado carácter estacional, seleccionando la vertiente sur en su sector mas central durante el invierno y la vertiente norte en los sectores central y occidental durante el estío (Antor et al., 2005). Las aves adultas sin territorio de reproducción se denominan “*flotantes*” (Antor, 2003). Este patrón de movimiento y asentamientos de jóvenes, inmaduros y adultos flotantes presenta una gran constancia interanual. Para reproducirse estos individuos flotantes tienen que esperar a que se produzca una vacante, conseguir desplazar a un propietario de un territorio o instalarse en un territorio nuevo. De este modo, la fracción flotante protege al segmento reproductor reemplazando con rapidez los reproductores que mueren (Antor, 2003) al constituir un aporte para el reclutamiento de ejemplares que amortigua las bajas producidas.

Mediante el radiomarcaje y seguimiento de ejemplares, se ha podido establecer la edad de la primera reproducción (Antor et al., 2007). Así, el Quebrantahuesos se

empareja a una edad media de 6.2 ± 1.2 años, (rango = 4-8, $n = 13$), realiza su primer intento reproductor con 8.4 ± 1.5 años, (rango = 6-10, $n = 53$) y se preproduce con éxito a la edad media de 10.0 ± 3.6 años, ($n = 3$). Las hembras tienden a emparejarse y reproducirse a una edad mas temprana (Margalida et al., 2005).

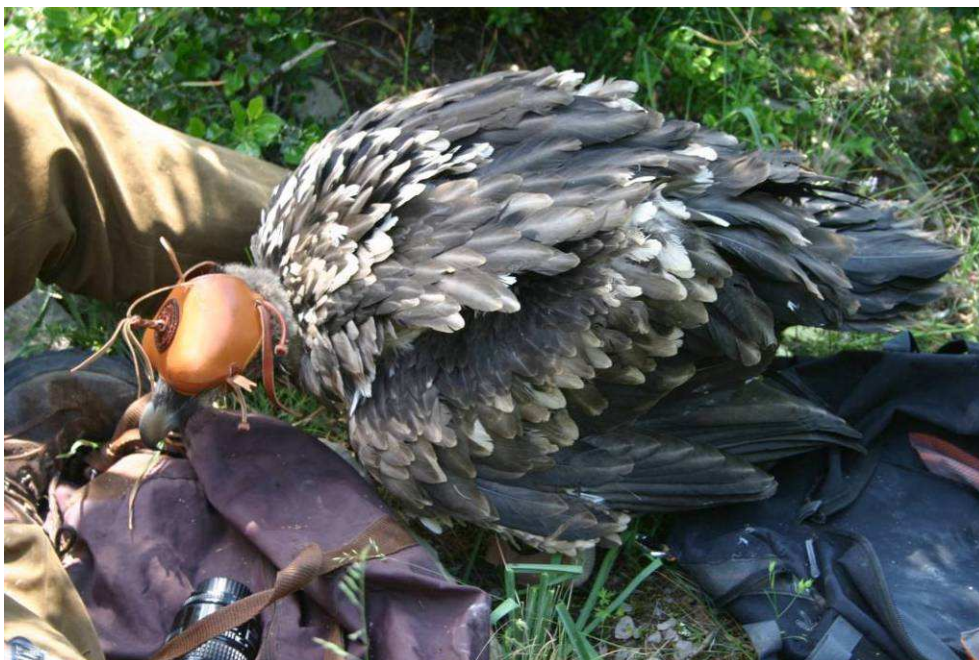


Imagen 2.24: Pollo de 90 días capturado en el nido para su radiomarcaje en el Pirineo navarro en 2008.

Generalmente se considera al Quebrantahuesos como una especie monógama; sin embargo, en los Pirineos se han encontrado formaciones de dos machos y una hembra (poliandria), siendo un hecho excepcional entre las aves (Donázar, 1991). Este fenómeno de formación de tríos poliándricos llegó a ocurrir en un 14% de los territorios ocupados, y su significado no estaba muy claro (Bertran y Margalida, 2002) aunque se relacionó con la saturación del área de distribución y al empaquetamiento de la población (Heredia y Donázar, 1990). La función que se ha dado a este tercer individuo, el segundo macho, es el de cooperante subordinado, de forma que en una especie longeva con un ciclo reproductor tan extenso y en el que invierten tanto esfuerzo, y en el que el éxito de la cría depende de un alimento espacial y temporalmente imprevisible, la colaboración de un adulto extra garantizaría llevarla a buen término a cambio de proporcionarle experiencia reproductora y la posibilidad de “heredar” un territorio de calidad o, incluso, una hembra reproductora (Bertran y Margalida, 2002).

2.5. Situación del Quebrantahuesos en Europa

El Quebrantahuesos se distribuye a lo largo de regiones montañosas de Eurasia y África, con las poblaciones más importantes en África oriental y meridional, y en Asia central e Himalaya (Antor et al., 2005). Originalmente la especie estaba ampliamente distribuida en los sistemas montañosos meridionales europeos. La persecución a la que fue sometido produjo una importante regresión en los dos últimos siglos, desapareciendo de la mayoría de las áreas donde estaba presente: Alpes, Balcanes, Cárpatos, Chipre,

Sicilia y Cerdeña. A pesar de los esfuerzos de conservación realizados durante las últimas décadas, esta tendencia ha continuado en la mayoría de las poblaciones autóctonas restantes, a excepción de la pirenaica.

En la actualidad la situación del Quebrantahuesos en Europa es preocupante ya que sólo persisten tres poblaciones autóctonas en Europa occidental: vertientes sur y norte de los Pirineos (España y Francia), Creta (Grecia) y Córcega (Francia). Estas poblaciones están completamente aisladas entre sí, y las dos últimas en inminente peligro de extinción y que parecen acumular todos los problemas intrínsecos al aislamiento, como baja productividad, envejecimiento poblacional y pérdida de recursos tróficos (Seguin et al., 2002; Xirouchakis 2002) y parecen abocadas en breve a una inexorable extinción (Heredia, 2005).

A lo largo del pasado siglo XX la especie se extinguió en los principales macizos montañosos (cordillera Cantábrica, Sistema Ibérico, Sistema Central, Sierra Morena, y sistemas Bético y Penibético) (Hiraldo et al., 1979; Heredia, 1991), siguiendo la tendencia general de la población europea. Actualmente la última población viable se localiza en la cordillera pirenaica en toda su extensión (Navarra, Aragón y Cataluña), y ocupa todos sus sistemas montañosos (Pirineo Axial, sierras interiores, y sierras exteriores). Existía un sólo núcleo extrapirenaico en los montes vascos, formado por unos pocos individuos territoriales que no llegaron a reproducirse con éxito y que en la actualidad se considera extinto. Igualmente, los avistamientos fuera de los Pirineos han dejado de producirse en muchas áreas y, en otras, con la frecuencia de los años 90.

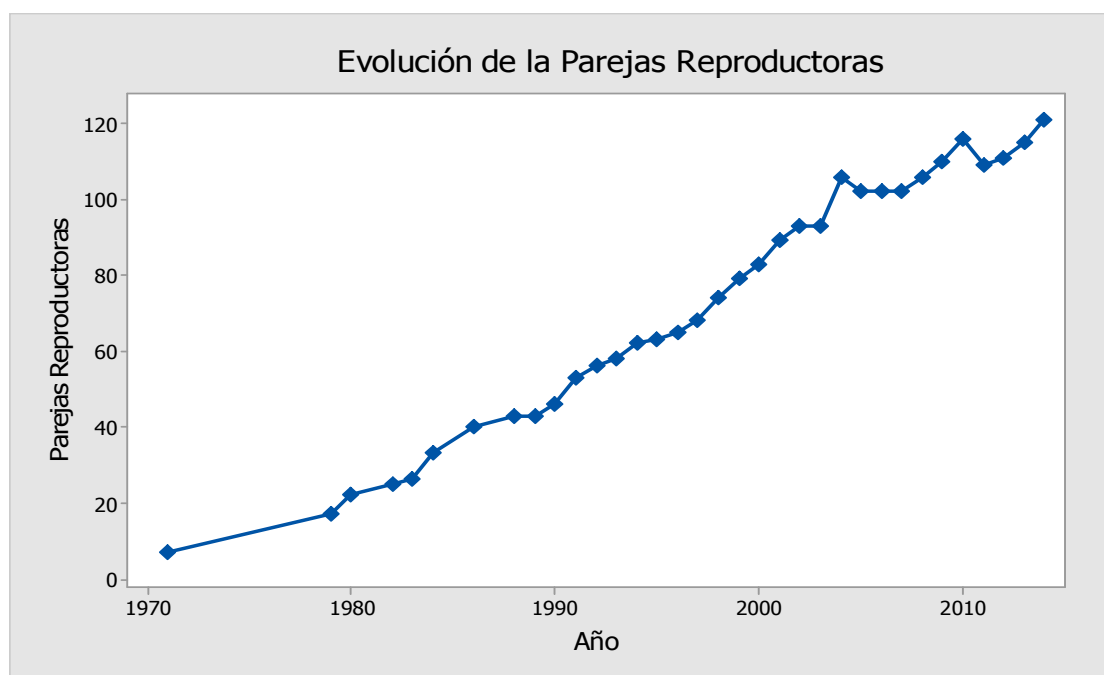


Figura 2.1: Evolución de la población pirenaica de Quebrantahuesos en las últimas décadas.
Fuente: Antoni Margalida.

La reintroducción del Quebrantahuesos en los Alpes marcó un punto de inflexión de la conservación de la especie a nivel europeo. El proyecto de reintroducción comenzó a finales de los años 70, liberándose los primeros ejemplares en Austria en 1986. En 1987

se amplió el área de reintroducción incluyendo Alta Saboya, y en 1992 se incluyó a Suiza. El primer intento de reproducción se registró en 1996 en Alta Saboya. La primera pareja que se reprodujo con éxito fue en 1997. Hasta la fecha se han liberado 210 en los Alpes. En la actualidad hay 9 parejas en Francia, 10 en Suiza, 9 en Italia y 3 en Austria. El proyecto ahora está entrando en su fase final, realizándose liberaciones de ejemplares para aumentar la diversidad genética de la población (siendo baja debido al reducido stock original) y asegurar el establecimiento de vínculos con la población pirenaica. Se proyecta liberar en los próximos años ejemplares en los Alpes Marítimos, los Alpes suizos y macizo central francés, precisamente para establecer un pasillo hacia los Pirineos y Andalucía y conectar así las tres metapoblaciones.

En Andalucía, el proyecto de reintroducción del Quebrantahuesos se puso en marcha en 1996. En mayo de 2006 se liberaron los tres primeros ejemplares y, tras la liberación de 31 ejemplares, en 2015 se ha constatado la primera reproducción con éxito en estas Sierras.

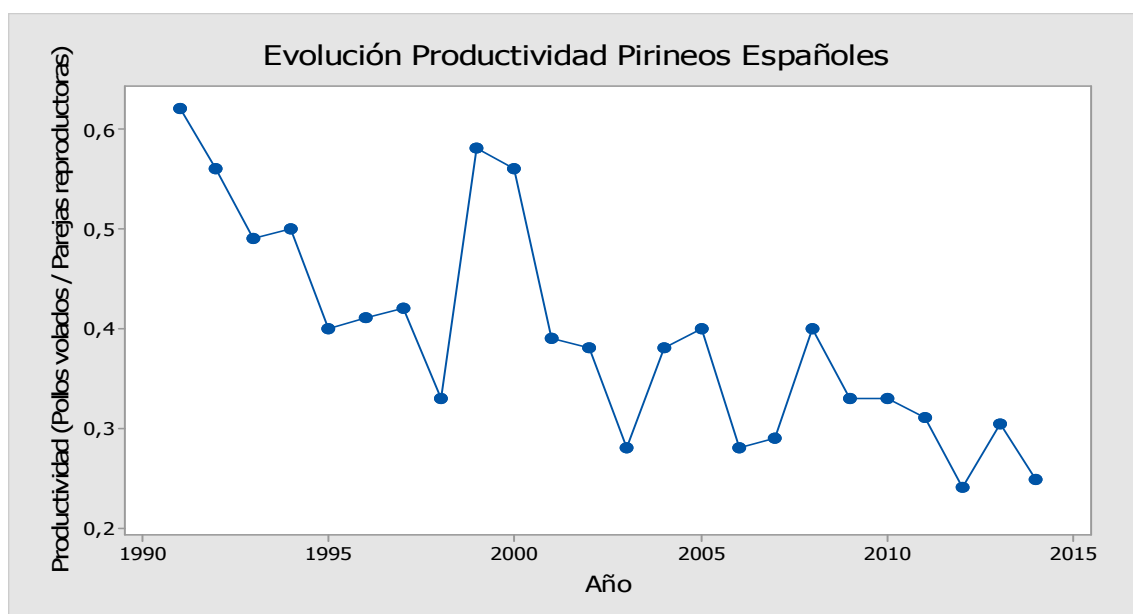


Figura 2.2: Evolución de la productividad de la población pirenaica española de Quebrantahuesos en los últimos 25 años. Fuente: Rafael Heredia.

2.6. Situación de la población en España.

En los Pirineos la especie comenzó a monitorizarse a comienzos de la década de los 70 (Heredia, 1983) y no fue hasta 1984 cuando fue objeto de un seguimiento anual en el que se censaban los territorios ocupados y las parejas reproductoras y se realizaba un seguimiento de la reproducción y de los parámetros reproductivos de la población. Desde 1986 hasta el año 2000, la población reproductora de la vertiente española de los Pirineos se duplicó, pasando de las 40 a las 88 unidades reproductoras (Heredia, 2005), constituyendo la mayor reserva de la población europea. La tasa anual de crecimiento se situaba en torno al 5% de la población reproductora y hasta el 7 % de la fracción adulta no reproductora (Antor, 2003). En este crecimiento sostenido influyó notablemente la alta tasa de supervivencia de la fracción preadulto, que constituía mas del 40 % de la

población pirenaica total. Se estimó que el tamaño de la población pirenaica preadulta pasó de unos 138 individuos en 1995 a 201 en el año 2002 (Antor et al., 2005). Y en esta alta tasa de supervivencia preadulta tuvieron un papel fundamental los puntos de alimentación suplementaria (Heredia y Margalida, 2002). Sin embargo, también se ha demostrado que, aunque garantizaban una supervivencia preadulta muy alta, tenían efectos negativos en las parejas que nidifican próximas al incrementar las interacciones conespecíficas y disminuir la calidad de los territorios para la cría (Carrete et al., 2006) mientras que tenían escasa o nula influencia en la supervivencia adulta (Oro et al., 2008).

Hasta finales de los años 90, la tendencia general de los parámetros reproductivos de la especie en los Pirineos mostraba un descenso progresivo de la productividad ligado a un aumento poblacional (Heredia y Margalida, 2003). Esto estaba relacionado con dos fenómenos; por un lado, al aumentar la población, se colonizaban territorios de calidad subóptima en hábitats marginales; por otro, se incorporaban a la población reproductora individuos con menor experiencia reproductora (Margalida et al., 2005).

A partir de finales de los años 90, tanto la productividad como el éxito reproductor fueron descendiendo progresivamente de forma significativa en la vertiente sur de los Pirineos, sin que fuera acompañado de un aumento proporcional de la población (Oro et al., 2008, Margalida et al., 2014). El descenso del éxito reproductor era debido a un incremento en los fracasos reproductores, y este fracaso se centraba en los periodos de final de la incubación y la eclosión (Hernández, 2005a). Mas del 53 % de los fracasos reproductivos se produjeron al final de la incubación y los primeros días de vida del pollo, en un 32 % durante la crianza y en un 10 % durante la incubación (Margalida et al., 2005). Los estudios que se realizaron en la década de los 90 y principios de los 2000 indicaban que los niveles de contaminantes organoclorados, incluidos los PCB's no eran los responsables del fracaso reproductor ni, por tanto, de la caída de la productividad y éxito reproductor (Hernández, 2005a). Igualmente, se encontró un alto nivel de fertilidad en las puestas y huevos analizados tras el fracaso, nivel que no se correspondía con una población expuesta a este tipo de contaminantes (Hernández, 2005b). Por lo tanto, la especie no presentaba problemas de infertilidad sino de fracaso reproductor.

Las causas del fracaso reproductor hay que buscarlas en factores externos a la pareja, como perturbaciones durante la reproducción, disminución de los recursos tróficos, causas naturales como la meteorología, depredación, competencia por los lugares de nidificación con otras especies o, por último, mortalidad no natural.

A finales de los 90 y principios de los 2000, se registraron varios episodios de mortalidad que revelaron que el envenenamiento de ejemplares era la principal causa de pérdida de ejemplares subadultos y adultos (Hernández, 2003). Los episodios de mortalidad afectaron a la población flotante de forma incluso más importante que a las fracciones preadulta y reproductora, provocando que las crisis se transmitieran finalmente al crecimiento de la población reproductora (Antor et al., 2005). Otros síntomas complementarios, como la presencia de subadultos entre los miembros de las parejas, también indicaban que la población estaba perdiendo la seguridad que proporcionaba un segmento flotante adecuado. Así, desde el año 1995 hasta el 2002 aumentó en un 300% la presencia, en las parejas reproductoras, de individuos en el último año de plumaje subadulto (Antor, 2003). Además el número de territorios ocupados por un sólo individuo

aumentó un 100% y el número de tríos disminuyó un 12,5% (Antor et al., 2005). Además, el retraso en la reocupación de algunos territorios que habían perdido un adulto, era un síntoma claro de la pérdida de la población flotante, al menos a nivel local. De esta forma, la fracción reproductora, al agotarse la población flotante, perdió el reclutamiento existente desde la fracción subadulto que había estado enmascarando la pérdida sistemática de ejemplares adultos (Antor et al., 2005).



Imagen 2.25: Ejemplar adulto encontrado muerto el Lleida en 2009.

Además, al contrario de lo encontrado en otras especies, se constató que la mortalidad aumentaba con la edad (Margalida y García, 2003). Este resultado no encajaba ni con el modelo teórico existente para la especie, ni con muchos de los estudios desarrollados en otras aves de gran longevidad (Antor, 2003). Este resultado sugería que los factores que estaban provocando la mayor parte de la mortalidad, estaban afectando menos a la fracción juvenil que a la preadulto y adulta (Antor et al., 2005; Hernández, 2005a). Probablemente esta baja mortalidad estaba relacionada con la mayor dependencia y utilización en los Pirineos de los puntos de alimentación suplementaria durante los primeros años de vida, que les proporcionaban alimento libre de tóxicos. Además, el pollo en sus primeras semanas de vida depende de un alimento muy diferente al de los adultos (Margalida et al., 2005), lo que incrementa las labores de campeo de los reproductores y la búsqueda selectiva de presas de menor tamaño y haciéndoles extremadamente sensibles a la ingestión de cebos envenenados o de pequeños mamíferos muertos por envenenamiento (Margalida et al., 2008).

La investigación y determinación de las causas de mortalidad en todos los ejemplares que se encontraron muertos desde 1994, tanto de la vertiente española de los Pirineos como de la vertiente francesa, reveló que el envenenamiento era la principal causa de muerte en las aves radiomarcadas (Hernández, 2003, Margalida et al., 2008). La intoxicación por plomo también se señaló como una posible causa de mortalidad (Hernández y Margalida, 2009) y no cabe duda de que el quebrantahuesos, como ave carroñera, puede ingerir accidentalmente perdigones al alimentarse con piezas de caza.

Así se encontraron varios ejemplares que mostraron niveles de plomo que indicaban un grado preocupante de exposición, y que dicha exposición era significativamente mayor en los ejemplares adultos (Hernández y Margalida, 2009).



Imagen 2.26: Envenenamiento masivo de buitres leonados en Cantabria en 2006. La llegada del veneno a los Pirineos y montañas del norte de España fue inevitable.



Imagen 2.27: Ejemplar adulto encontrado muerto en el nido en la provincia de Huesca en 2005 (Foto P. Barrachina).

El quebrantahuesos es una especie muy sensible a los venenos y aunque hasta 1996 se registraron casos ocasionales de envenenamiento, el uso ilegal de venenos se extendió de forma muy alarmante por todo el territorio español (Hernández, 2001). Cada año, las diferentes Administraciones públicas tenían constancia de cientos de casos de envenenamiento que afectan incluso a especies amenazadas y tan emblemáticas como el Águila imperial (*Aquila adalberti*), el Oso pardo (*Ursus arctos*) o el Buitre negro (*Aegypius monachus*). Además, los venenos estaban diezmando las poblaciones de otras especies protegidas como el Milano real (*Milvus milvus*), el Milano negro (*Milvus migrans*), el Buitre leonado (*Gyps fulvus*), el Alimoche (*Neophron percnopterus*), el Águila real (*Aquila chrysaetos*) y el Águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*).

El veneno tiene tres características que reforzaban su impacto sobre el quebrantahuesos (Hernández y Margalida, 2008 y 2009): en primer lugar, no es selectivo y afecta por igual a cualquier especie silvestre; en segundo lugar, incide sobre todo en la población adulta reproductora; y, por último, es difícil de detectar, tanto en las víctimas como en el campo (Hernández, 2001). Su uso, ya sea como método de control de predadores o con cualquier otro fin, está expresamente prohibido por las directivas de la Unión Europea, por varios convenios internacionales y estrictamente en el ámbito legislativo nacional y autonómico español.

Estas prohibiciones no son gratuitas, sino que responden a criterios objetivos de conservación de la fauna silvestre, por su falta de selectividad y el gran impacto que demostró en el pasado sobre las especies hacia las que no iba dirigido. Según el Grupo de Trabajo sobre Ecotoxicología del Comité de Flora y Fauna Silvestres, por cada zorro que muere envenenado mueren siete ejemplares de especies protegidas (Hernández, 2001).

Los venenos no son selectivos ni con la especie ni con los individuos. De hecho, están diezmando a los mejores ejemplares de las poblaciones de especies protegidas, a los ejemplares en mejor condición física (Hernández y Margalida, 2008 y 2009). Y, por supuesto, entre ellos se encuentran los adultos reproductores, lo que afecta a un grupo decisivo para la dinámica de cualquier población (Margalida et al., 2008). Como el veneno incide directamente en los adultos, en los ejemplares con mayor experiencia reproductora, el primer efecto que se detecta es un descenso de la productividad y del éxito reproductor.

Por otra parte, los ejemplares intoxicados mueren en cualquier sitio, pero sobre todo en lugares inaccesibles o poco transitados, que son los que frecuentan habitualmente (Hernández, 2001). De ahí que se detecten muchos menos casos y que el radioseguimiento se convirtiera en una herramienta vital para tener una idea más certera de las causas de mortalidad. Las bajas por disparo o por accidentes en las líneas eléctricas son más fáciles de detectar porque ocurren en medios humanizados e incluso el propio tendido sirve de guía para localizar a los animales electrocutados.

Tanto es así que el 81% de los quebrantahuesos muertos fueron localizados gracias a la señal de su radioemisor y, en vista de dónde aparecieron, casi todos ellos habrían pasado desapercibidos si no hubieran estado marcados (Margalida et al., 2008). Esto explicaba las diferencias que se aprecian al valorar las causas de mortalidad entre

ejemplares marcados y seguidos y ejemplares hallados muertos aleatoriamente. Si conocemos el número de bajas, el de sustituciones en las parejas reproductoras y el de ejemplares muertos, podemos calcular el porcentaje de animales que se recuperan tras morir envenenados. En el caso del águila imperial es de en torno al 10%, mientras que en el quebrantahuesos puede situarse en el 8% (Hernández y Margalida, 2009). Esto nos obliga a considerar las cifras de mortalidad en términos relativos, nunca como valores absolutos. No indican realmente lo ocurrido, sino sólo un porcentaje de las bajas producidas, la punta de un iceberg.

El peligro que supone la llegada del veneno a la población pirenaica había sido advertido en las reuniones del Grupo de Trabajo sobre Ecotoxicología a finales de los 90. En 1999 el veneno irrumpió de forma violenta en Navarra. En Huesca había repuntado tímidamente poco tiempo antes y fue en el 2000 cuando empezó a actuar con toda virulencia. En el 2001 se registraron los dos primeros casos de envenenamiento en Francia y en el 2002 llegó a Cataluña. El auge del veneno en España hacía inexorable que tarde o temprano alcanzara el Pirineo.

El quebrantahuesos se considera un mal colonizador, pero hay que tener en cuenta que en ocasiones no se dan las condiciones idóneas para que la instalación en nuevas áreas (Hernández, 2010). Las observaciones de ejemplares fuera de los Pirineos mostraban la tendencia natural de la especie a expandirse hacia el oeste (Antor et al., 2005). Pero los asentamientos más estables, situados en los Montes Vascos, se caracterizaban precisamente por un aporte continuo de individuos y su sistemática desaparición. Este patrón de mortalidad ligada al envenenamiento se había observado en el Alimoche, otra especie de buitre muy próxima al Quebrantahuesos (Hernández y Margalida, 2009), donde algunas regiones actuaban como sumidero de individuos y la pérdida sistemática de adultos afectaba a otras áreas de la población, a veces alejadas varios cientos de kilómetros. Hasta qué punto estas zonas de expansión natural y otras potenciales de dispersión juvenil eran en realidad sumideros de individuos es algo que se debió investigar de forma prioritaria para gestionar la conservación del Quebrantahuesos en los Pirineos (Hernández, 2003).

La mortalidad por veneno ha desplazado a otras causas de mortalidad, como la colisión contenidos o la caza ilegal (Margalida et al., 2008). La aparición súbita de un factor de mortalidad no natural, como ha ocurrido con la mortalidad por veneno, muy centrada en la fracción de adultos y subadultos, tiene efectos devastadores sobre la dinámica de la población de una especie longeva, de baja productividad y de elevada edad de primera reproducción como es el Quebrantahuesos (Oro et al., 2008; Margalida, et al., 2014). La intoxicación por ingestión de fármacos veterinarios que contaminaban los cadáveres de animales domésticos ha tenido también efectos devastadores en varias especies de buitres (Oaks et al., 2004; Green et al., 2004; Donazar et al., 2009). La contaminación de los cadáveres con el antiinflamatorio no esteroideo diclofenaco ha tenido consecuencias devastadoras en el subcontinente indio, ya que ha reducido en casi un 90 % las poblaciones de tres especies de buitres en apenas una década (Oaks et al., 2004) y amenaza las poblaciones en otras regiones (Naidoo, et al., 2009).

En la UE en los años 2000 hubo una política sanitaria muy restrictiva en cuanto al abandono de cadáveres de animales domésticos en el campo, política que chocaba

frontalmente con la política de conservación de las especies carroñeras (Margalida et al., 2014). La aparición la Encefalopatía Espongiforme Bovina en 2001 llevó a una estricta regulación de los materiales de riesgo (Directiva CE 1774/2002) que restringió el uso de subproductos animales y que obligó al cierre de los muladares y a la destrucción de los cadáveres de animales domésticos en plantas especializadas (Tella, 2001, Donazar et al., 2009) y fue aplicada en todo el territorio nacional en 2004. Los resultados no tardaron en verse, y especies como el Buitre leonado han visto reducidos de forma significativa el éxito reproductor y la tasa de crecimiento de la población, detectándose un incremento en la mortalidad juvenil e importantes cambios en la dieta y el comportamiento (Donazar et al., 2010; Zuberogoitia et al., 2010).

En el Quebrantahuesos la aplicación de estas restricciones ha hecho disminuir la supervivencia subadulta y el éxito reproductor y ha retrasado las fechas de puesta (Margalida et al., 2014). Igualmente se ha encontrado una reducción en el número de puestas dobles y un incremento en la mortalidad no natural debido al incremento de las áreas de campeo y la explotación de otros recursos tróficos alternativos (Margalida et al., 2014). Hasta la fecha todavía se sigue discutiendo en la UE las regulaciones en esta materia que hagan compatibles la política sanitaria y la conservación de las aves carroñeras (Donazar et al., 2009).

2.7. Justificación y objetivos de la tesis.

Aunque las causas del fracaso reproductor son muy difíciles de determinar, el seguimiento de la reproducción permitió aproximarse a las causas naturales. Así, se describieron como las mas importantes las interacciones con conespecíficos, relacionadas con un fenómeno de regulación denso-dependiente (Carrete et al., 2006) por las interferencias con conespecíficos o debido a la heterogenicidad del hábitat, así como las interferencias con otras especies, especialmente con buitres leonados (*Gyps fulvus*) (Margalida y Bertran, 2005), las variaciones en los recurso tróficos o los efectos de la meteorología adversa (Margalida et al., 2005).

En el Pirineo, los fracasos reproductores presentan una marcada variabilidad interterritorial, sugiriendo que en cada territorio pueden operar diferentes factores (Margalida y García, 2003). Los estudios sobre reproducción indican que la fase mas crítica es la eclosión, con un 20 % de los fracasos durante la incubación, un 51% durante la eclosión y un 28% durante la crianza del pollo (Margalida et al., 2004).

Por ello, se hace fundamental, para la investigación de las causas del fracaso reproductor, el disponer de una herramienta que nos permita determinar en cada caso que es lo que desencadenó el fracaso en la reproducción. Sólo a través del estudio patológico sistemático de las puestas y huevos que fracasan podemos monitorizar la reproducción de la especie y determinar las causas que la están condicionando.

Sin embargo, si en algo se caracteriza el Quebrantahuesos es por su peculiar comportamiento reproductivo que le hace elegir lugares inaccesibles y de difícil control para la cría, iniciar la reproducción en pleno invierno y ser extremadamente sensible a las molestias, haciendo extremadamente difícil su seguimiento. Si a estos factores, le unimos

el hecho de que puestas y huevos están sometidos a una importante presión depredadora y que los nidos son usurpados con cierta frecuencia por otras especies, tenemos un escenario en el que resulta enormemente difícil investigar las causas del fracaso en la reproducción.



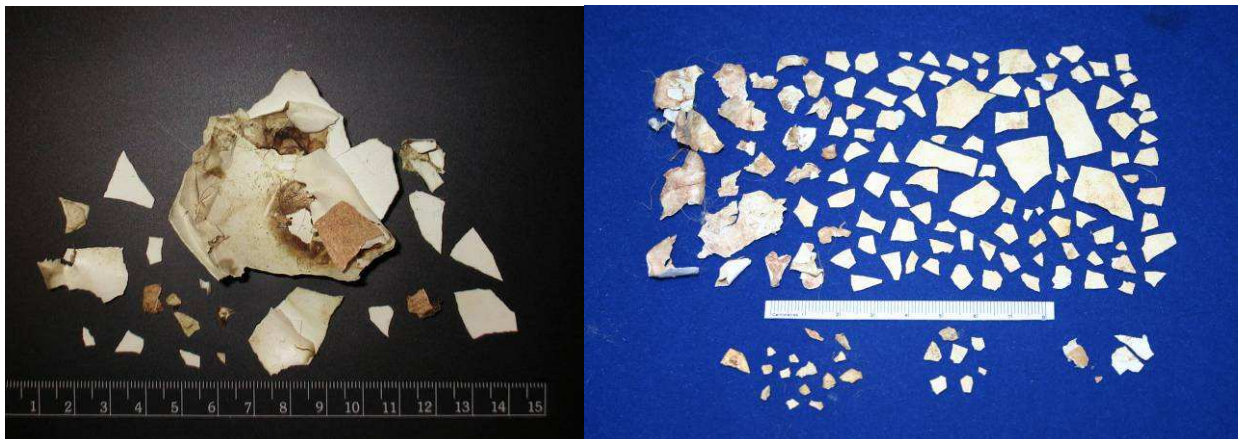
Imágenes 2.28 y 2.29: Acceso a los nidos para la recogida de muestras en la investigación de la causa del fracaso reproductor.

En esta dificultad reside la importancia de desarrollar una herramienta que nos permita explotar al máximo cualquier resto o evidencia que sea recuperado de un nido tras el fracaso. En la mayoría de los casos, el único material que se recupera tras la inspección del nido, si había habido puesta, son fragmentos de cáscara de los huevos.

El objetivo de esta tesis es el desarrollar esta herramienta que permita investigar la cáscara del huevo de Quebrantahuesos con ayuda de un microscopio electrónico de barrido para determinar las causas del fracaso reproductor. El estudio de la ultraestructura de la cáscara de huevos depositados en colecciones de museo y colectados en el siglo XIX, antes de la generalización del uso de pesticidas, nos ha permitido conocer y caracterizar la ultraestructura normal de la cáscara del huevo de Quebrantahuesos, y a través del estudio de fragmentos de cáscara de huevos actuales, en ocasiones de dimensiones tan ridículas como 1X1 mm, hemos podido determinar la fertilidad, el desarrollo embrionario y el momento del fracaso, la posible exposición a plaguicidas, el orden de puesta o incluso si los fragmentos pertenecen a otra especie y ha habido usurpación del nido.



Imagen 2.30: *Huevo abortado en uno de los nidos de una pareja de Quebrantahuesos de la provincia de Huesca. El análisis del huevo reveló que era de Buitre leonado y que el nido había sido usurpado.*



Imágenes 2.31 y 2.32: *Fragmentos de huevos recuperados en sendos nidos de Lleida (izquierda) y Huesca (derecha). La investigación con microscopía electrónica comprende determinar si todos los fragmentos pertenecían al mismo huevo, si hubo desarrollo embrionario y la determinación del momento del fracaso y si estaba contaminado con pesticidas.*

CAPITULO 3. LA ULTRAESTRUCTURA DE LA CASCARA DEL HUEVO

3.1. La cáscara del huevo de las aves.

La reproducción ovípara para un animal volador tiene muchas ventajas. Proporciona a su descendencia en la etapa mas temprana de su desarrollo, un ambiente favorable que cubre sus necesidades mientras la madre está libre para la búsqueda de alimento o para escapar de sus predadores. Las aves comparten este método de reproducción con algunos artrópodos, peces, anfibios y muchos reptiles entre otros seres vivos. En los mamíferos, la evolución ha hecho que el embrión se desarrolle dentro de la madre. La razón porque las aves mantienen este sistema de reproducción primitivo probablemente esté relacionada con la necesidad de tener un bajo peso corporal para poder volar (Fitter, 1973).

El huevo de las aves es un sistema vital casi autosuficiente para el desarrollo del embrión. La cáscara del huevo sirve, además de para proporcionar aislamiento y protección mecánica al embrión durante su desarrollo, de barrera física para detener el desarrollo de los microorganismos, de fuente de calcio y magnesio para su desarrollo y regula pasivamente el intercambio gaseoso del embrión con el medio exterior (Fox, 1976). Todas estas funciones son vitales para el éxito en el desarrollo y supervivencia del embrión.

El huevo requiere únicamente de un aporte de calor y de movimientos de volteo proporcionados por los adultos durante la incubación para iniciar y finalizar su desarrollo. Dado que no existe movimiento de aire dentro del huevo ni posibilidad de movimientos respiratorios, el intercambio gaseoso tiene lugar por difusión pasiva de los gases a través de los poros de la cáscara. La regulación de este intercambio gaseoso es, quizás, el papel más importante que tiene la cáscara para el desarrollo del embrión (Ar y Rahn, 1979) y el estudio de cómo la cáscara regula de forma pasiva éste ha sido objeto desde hace varias décadas de numerosos estudios (Tyler, 1969; Revén, 1970; Tullet, 1975; Becking, 1975; Massaro et al., 2004a; Massaro et al., 2004b).

En todas las aves, durante la incubación, se produce una disminución continua del peso del huevo, disminución que es debida a la pérdida de agua a través de la cáscara, y cuya cantidad representa un constante en todas las aves de entre un 16 y un 18 % del peso inicial del huevo (Board, 1982; Balkan et al., 2006; Burnett et al., 2013). El embrión tiene necesidad de perder agua durante la incubación, en primer lugar por ser un metabolito de la lipólisis, es decir, uno de los productos finales de la utilización de las reservas grasas del huevo, pero también para que pueda formarse una cámara de aire dentro del huevo que permita el inicio de la respiración pulmonar del embrión, justo antes del nacimiento, y para que éste pueda realizar los movimientos necesarios para romper la cáscara al nacer (Rahn et al., 1974).

En el centro del huevo está la yema, que constituye la principal reserva de nutrientes para el embrión. Éste comienza a desarrollarse desde el disco germinal en la superficie externa de la yema. La yema está formada mayoritariamente por lípidos, un complejo de lipoproteínas de origen hepático con alto contenido en colesterol. Contiene además vitaminas A y D, calcio y magnesio, un porcentaje menor de proteínas y un 50% de agua (Solomon, 1997). La cantidad de yema del huevo varía entre un 20 y un 35% del peso, en

función de la especie y del grado de desarrollo del pollo al nacer. Cuanto mayor es la proporción de yema en el huevo, mayor es el desarrollo del pollo al nacer.

El disco germinal necesita estar en la parte superior del huevo para un correcto desarrollo. Esto se consigue al estar cubierto y protegido por la membrana vitelina, que hacia los polos se continúa en una cintilla enrollada denominada chalaza, firmemente adherida a las membranas, y que mantiene la yema suspendida de forma que permite la rotación del huevo y amortigua cualquier movimiento que se produzca.

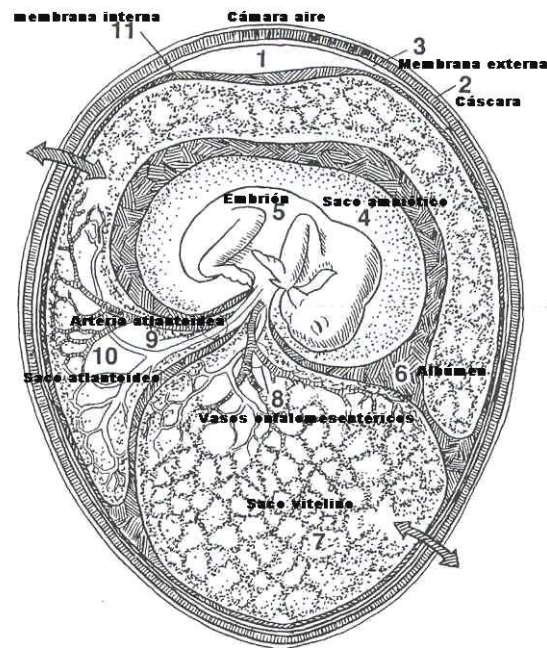


Imagen 3.1: Componentes del huevo de las aves.

Alrededor de la yema está el albumen, de densidad líquida, pero con una parte central mas gelatinosa. El albumen está formado en un 80% por agua y el resto por una fracción proteica, con ovoalbúmina, que mantiene la integridad estructural del huevo, así como ovotransferina y lisozima, con propiedades antimicrobianas (Solomon, 1997). El albumen tiene gran capacidad de retención hídrica para minimizar las pérdidas excesivas de agua por evaporación a través de los poros de la cáscara.

Alrededor del contenido, dos gruesas membranas, las membranas testáceas externa e interna, sirven de soporte tectónico para la formación de la cáscara. Ambas membranas constituyen una eficiente barrera contra la traslocación bacteriana (Arias et al., 1991a). Conforme avanza la incubación, el huevo va perdiendo peso debido a la pérdida de agua por evaporación, ambas membranas se separan en el polo mas ancho del huevo y llegan a formar una cámara de aire. Esta cámara de aire va aumentando hasta permitir la respiración pulmonar del pollo justo antes de la eclosión, cuando rompe con el pico la membrana interna.

Por último, la cáscara es una estructura cristalina formada mayoritariamente por carbonato cálcico sobre una matriz proteica. El carbonato cálcico proviene de la dieta, por

lo que la hembra tiene que desarrollar un depósito extra en los huesos y así sufre un proceso de osificación medular, llamado hiperostosis fisiológica, para poder contar con suficientes reservas de calcio para la oviposición.



Imagen 3.2: Radiografía ventrodorsal de una hembra de azor tiroteada en pleno periodo reproductor. Se aprecia la hiperostosis fisiológica en ambas tibias que constituye la reserva de calcio para la oviposición.

3.2. Organización estructural y ultraestructural de la cáscara del huevo.

La cáscara del huevo es una estructura enormemente resistente. Se ha calculado que un huevo de gallina puede soportar una presión equivalente a 10 ton por cm² (Fitter, 1973). Esta dureza se consigue con la especial disposición de los cristales de carbonato cálcico, que actúan bajo la presión como las piedras de un arco; la presión externa fuerza a unos cristales contra otros. En contrapartida, la cáscara es lo suficientemente frágil en su polo mas ancho como para permitir su rotura por un pollo relativamente débil (Fitter, 1973).

La cáscara y el contenido están íntimamente interrelacionados (Solomon, 1997), ya que ambos proporcionan un microambiente para el desarrollo embrionario. La cáscara le aporta calcio y magnesio y regula pasivamente la difusión del oxígeno y el dióxido de carbono.

El fundamental papel que desempeña la cáscara durante el desarrollo embrionario está relacionado precisamente por este control de la pérdida de agua sin mermar las necesidades respiratorias del embrión, y en esta regulación juega un papel muy importante la estructura de la propia cáscara, que constituye un sistema biológico único en muchos aspectos. Por ello, ha sido objeto de numerosos estudios desde que en 1830 Purkyne describiera por primera vez la estructura de la cáscara del huevo de gallina (Arias et al., 1991b). Este investigador checo fue capaz de observar detalladamente y dibujar con

extraordinaria exactitud muchas de las imágenes de la cáscara de huevo que hoy sólo se obtienen mediante microscopía electrónica de barrido. Las primeras caracterizaciones de la estructura de la cáscara del huevo datan del siglo XIX. Los primeros estudios ya mostraron que la cáscara del huevo de gallina corresponde a una estructura altamente ordenada compuesta de múltiples capas y matrices calcificadas (Tyler, 1964; Arias et al., 1991b).

La cáscara del huevo de aves es un ejemplo de mineralización biológica. Tanto las cáscaras de los huevos de las aves y algunos reptiles, como las conchas de moluscos, los huesos y los dientes son fabricados combinando fibras orgánicas con cristales inorgánicos (Arias et al., 1991a). Así, se han considerado cerámicas naturales, y se caracterizan por estar producidas a relativamente bajas temperaturas y mediante mecanismos biológicos (Arias et al., 1991b).

El proceso de mineralización biológica está ampliamente distribuido en la naturaleza. Bajo condiciones fisiológicas, el resultado del depósito de mineral en los sistemas biológicos está representado por la formación de huesos, dientes, cáscaras, caparazones, corales, perlas, etc. El proceso de biomineralización es responsable también de algunos fenómenos patológicos en vertebrados como la formación de calcificaciones distróficas, ectópicas o la formación de cálculos urinarios o biliares. La biomineralización puede ser definida como una secuencia de eventos en los cuales los minerales secretados en solución por células particulares cristalizan y se estructuran juntos de forma ordenada y predecible (Arias et al., 1991a). Los elementos resultantes de este proceso tienen una característica común, están compuestos por una fase inorgánica, frecuentemente sales de calcio, y una fase orgánica que puede estar compuesta por proteínas (fosfoproteínas, glicoproteínas), polisacáridos, lípidos y, normalmente, por una mezcla de varios de ellos.

En todo sistema biomineralizado se encuentran dos fases: una matriz orgánica y una fase mineral cristalina, razón por la cual los sistemas biomineralizados son considerados como biocerámicas (Heuer et al., 1992; Arias y Fernández, 1993). Estas cerámicas naturales se forman generalmente en un medio acuoso, a relativamente bajas temperaturas y hasta donde se conoce, su formación es regulada por una matriz orgánica (Arias et al., 1991 a; Arias et al., 1992). La velocidad de depósito de la parte inorgánica de estas biocerámicas varía desde unos pocos gramos al año, como en la formación del nácar de la concha de un molusco, hasta el extremo de cinco gramos de calcio por día como ocurre en la cáscara de huevo de la gallina. Esto hace de la cáscara de huevo un modelo muy conveniente para el estudio de la biomineralización (Arias et al., 1993) y por ello en las últimas décadas ha recibido una especial atención (Arias et al., 1991a; Arias et al., 1992; Arias y Fernández 1993).

Los primeros estudios ultraestructurales de la cáscara de los huevos de aves silvestres se realizaron hace relativamente poco tiempo (en los años 60) a raíz de ser detectados los efectos que producía a contaminación química en las aves silvestres. El primer estudio sobre la ultraestructura de la cáscara de las aves silvestres se remonta a 1971 (Simons, 1971).

La primera descripción detallada de la ultraestructura y composición de la cáscara del huevo en aves es la de Becking (1975), cuya nomenclatura ha sido la más adoptada en estudios posteriores. Igualmente Tyler (1966 y 1969), McFarland et al. (1971), Kiff et al.

(1979), Cooke (1979) y Hunt et al. (1992) proporcionan abundante información sobre la ultraestructura y composición del huevo de las aves domésticas y silvestres y, a partir de los años 70, de los cambios ultraestructurales que se estaban produciendo debido al efecto indirecto de los pesticidas y contaminantes químicos en los huevos de las aves silvestres.

Desde entonces se ha acumulado mucha información sobre la estructura normal de la cáscara en muchos grupos de aves y su estudio se ha perfilado como una herramienta útil a la hora de valorar adaptaciones fisiológicas de las diferentes especies a las condiciones climáticas y físicas de sus hábitats, pero también a la hora de determinar las causas de fracaso reproductor (Fox, 1976 y 1979; Kiff et al., 1979; Grubb et al., 1990; Bland, 1992).

A pesar del gran número de estructuras minerales diferentes que se han identificado en los organismos vivos, las cuatro formas más frecuentes de minerales de calcio son calcita, aragonita, vaterita e hidroxiapatita. Las tres primeras son polimorfismos minerales del carbonato cálcico, mientras que la hidroxiapatita es un fosfato de calcio cristalino, también llamado osteide por ser el componente principal de los huesos. La cáscara del huevo de las aves está formada por una fase orgánica y otra inorgánica. Químicamente está compuesta de 1,6% de agua, 95,1 % de minerales, de los cuales 93,6% corresponden a carbonato de calcio (Imagen 3) en forma de de cristales de calcita, 0,8% de carbonato de magnesio y 0,73% de fosfato tricálcico, sobre una matriz orgánica de naturaleza proteica (3.3%) (Arias et al., 1991a).

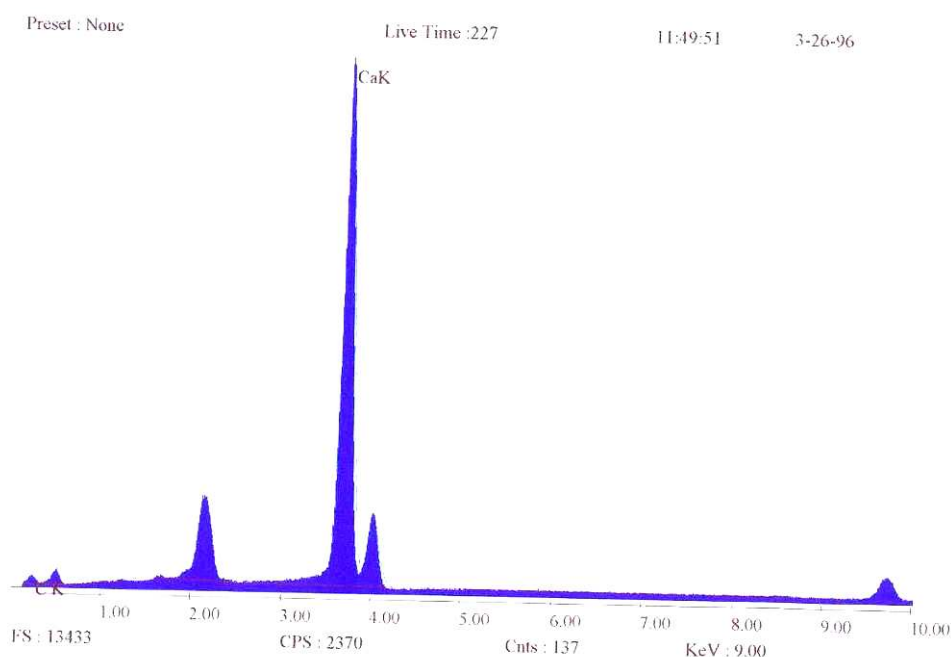


Imagen 3.3: *Espectro de composición semicuantitativa de la cáscara de un huevo de Quebrantahuesos visto al microscopio electrónico de barrido. La composición de la matriz orgánica es casi exclusivamente de carbonato de calcio.*

En todas las aves, el componente químico principal que forma la cáscara son los cristales de calcita. En algunas especies se ha encontrado también fosfato octocálcico (vaterita) y aragonita (Revén, 1970) en mayores proporciones y Board (1981) describió

además en algunas especies de aves silvestres, adaptaciones muy concretas en las que aparecen también ciertas cantidades de otras formas de carbonato cálcico así como diversos compuestos ricos en azufre.

La cáscara representa en los vertebrados una excepción en las estructuras orgánicas calcificadas en el sentido de que no está formada por fosfato cálcico y es acelular (Nys et al., 1999) a diferencia de otras estructuras orgánicas calcificadas como el hueso o los dientes. La relación Ca:P en la cáscara es mucho mayor que en el hueso. Además representa la estructura orgánica que es calcificada con mayor rapidez (apenas unas horas) sin que ello suponga una merma en la resistencia o la dureza de la estructura (Arias et al., 1991b).

La cáscara del huevo se compone de las membranas testáceas externa e interna, la cáscara mineralizada propiamente dicha y la cutícula externa (Becking, 1975). Existen varias terminologías para definir las diferentes partes de la porción mineralizada de la cáscara del huevo, diferencias que se deben a la variabilidad que dentro de las aves existe en cuanto a tipos de cáscaras o de organizaciones de la cáscara.

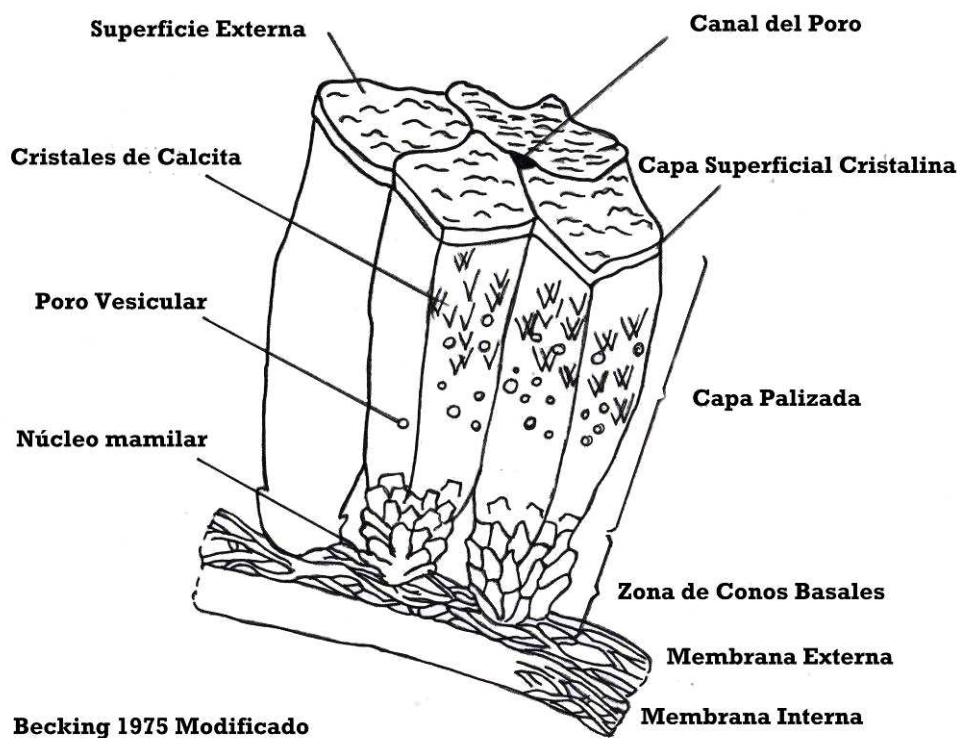


Imagen 3.4: Ultraestructura de la cáscara del huevo de las aves según Becking (1975).

La nomenclatura mas aceptada en al descripción de la cáscara calcificada es la de Becking (1975), que a su vez está basada en la que en su día hicieron Tyler (1964) y Simons (1971). Así, diferencian dos capas, mamilar, mas interna e íntimamente ligada a las membranas, y que contiene los conos basales, y palizada, que contribuye a la mayor parte del espesor de la cáscara calcificada.

Además, reconocen una tercera capa externa, de presencia no constante en el huevo de todas las aves que denominaron "*Capa Cristalina Superficial*" por la diferente orientación de los cristales de calcita respecto a la capa palizada (Becking 1975). Posteriormente, Cooke (1979) y Board (1981) describen en aves silvestres una tercera capa mas exterior a la capa palizada que, por su aspecto, recibió el nombre de "*capa reticular*" o "*capa esponjosa*". Así, estos autores consideran que en algunas especies de pequeño tamaño, la cáscara es "incompleta" ya que carece de la tercera capa externa (reticular) y estar formada casi enteramente por una capa palizada altamente vesicular (Mikhailov, 1997; Gosler et al., 2005).

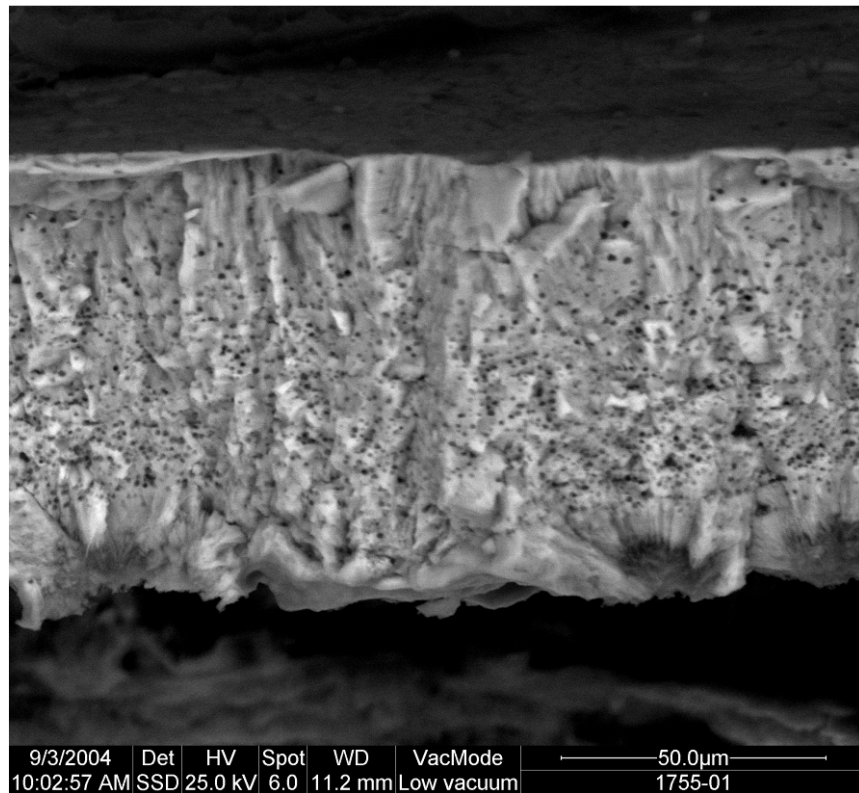


Imagen 3.5: Ultraestructura de la cáscara de un huevo de gallina en la que se identifican las dos capas descritas por Becking (1975) así como el aspecto cristalino de la parte mas externa de la cáscara que se denominó *Capa Cristalina Superficial*.

Posiblemente estas diferencias guardan mas relación con la especie que con el tamaño del huevo ya que las especies de la misma familia presentan la misma organización estructural con independencia del tamaño (Tyler, 1966; Simons, 1971). Quizás la capa cristalina superficial que describió Becking (1975) cumple en las aves de pequeño tamaño con la importante función que durante la incubación tiene la capa reticular sin incrementar el espesor de la cáscara o la cantidad de calcio depositada (Solomon, 1997; Gosler et al., 2005).

De hecho, se ha encontrado que las aves de pequeño tamaño no producen hueso extramedular (hiperóstosis fisiológica) por lo que se encuentran en una situación de "déficit de calcio" en el momento de la oviposición (Solomon, 1997; Gosler et al., 2005). En estas especies, la pigmentación de la cáscara por protoporfirinas puede compensar el reducido

espesor (Fox, 1976) y contribuir de forma significativa a mantener la dureza de la cáscara y conservar la correcta permeabilidad y pérdida de agua en las cáscaras finas, sin que sea necesaria una mayor deposición de calcio (Gosler et al., 2005).

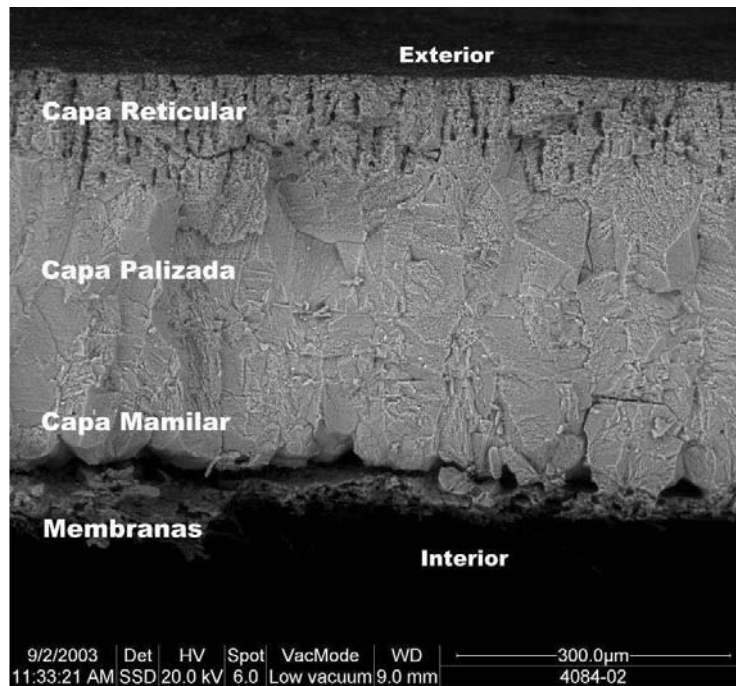


Imagen 3.6: Ultraestructura de la cáscara de un huevo de un Águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*). Se reconocen y diferencian las tres capas de la cáscara calcificada.

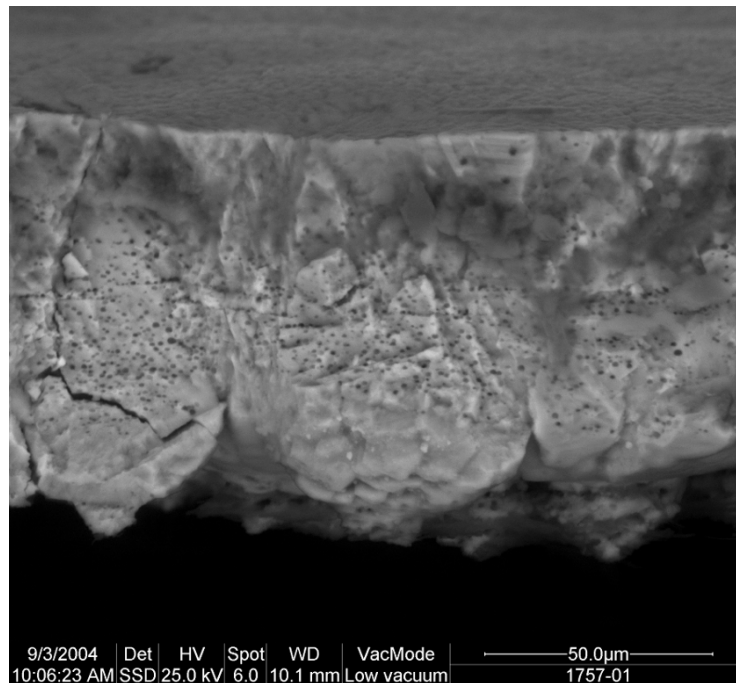


Imagen 3.7: Ultraestructura de la cáscara de un huevo de una Perdiz Roja (*Alectoris rufa*) muy similar a la cáscara de la gallina.

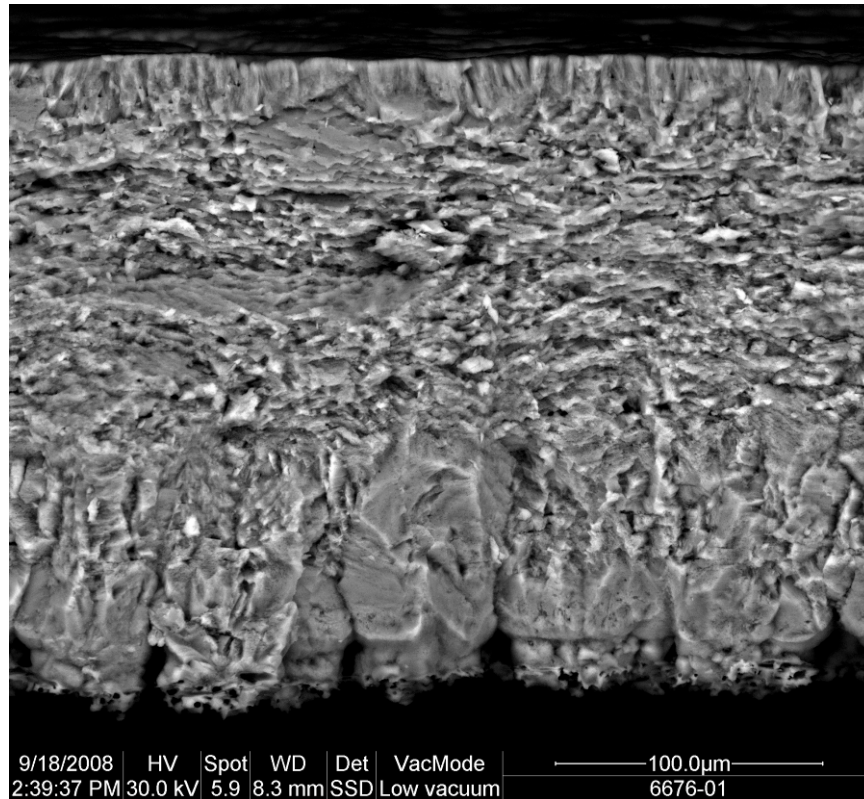


Imagen 3.8: Ultraestructura de la cáscara de un huevo de *Urogallo pirenaico* (*Tetrao urogallus*) similar al huevo de las Galliformes, pero con mayor grado de cristalización. La capa cristalina superficial se encuentra mas definida.

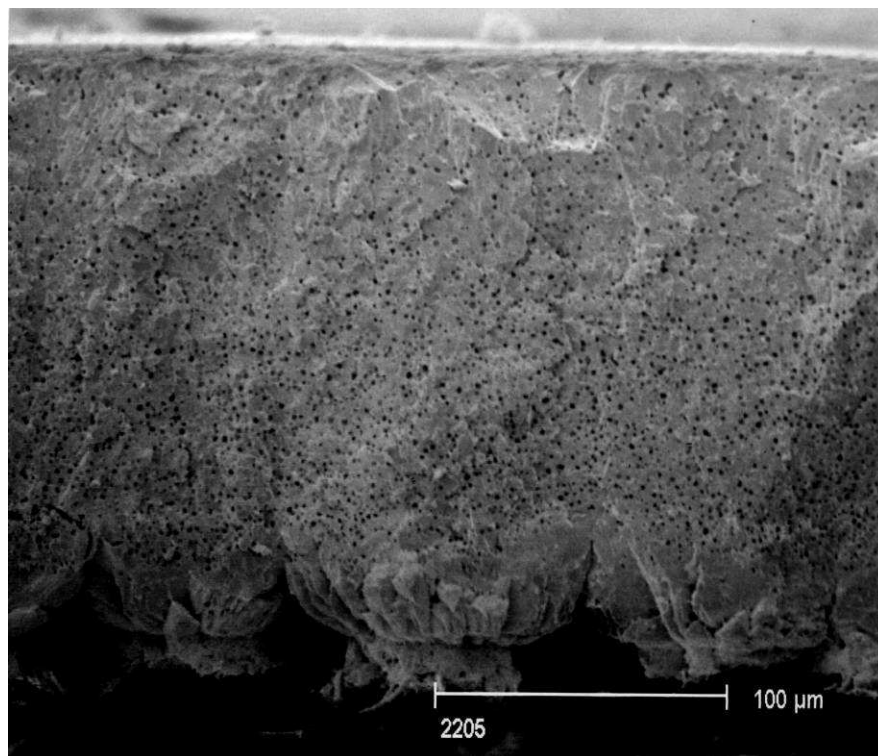


Imagen 3.9: Cáscara de un huevo de loro *Eclectus* (*Eclectus roratus*) con una capa palizada altamente vesicular, típica de las aves tropicales (Becking, 1975).



Imagen 3.10: Ultraestructura de la cáscara de un huevo de Avutarda (*Otis tarda*) mostrando la estructura exacta descrita por Becking (1975).

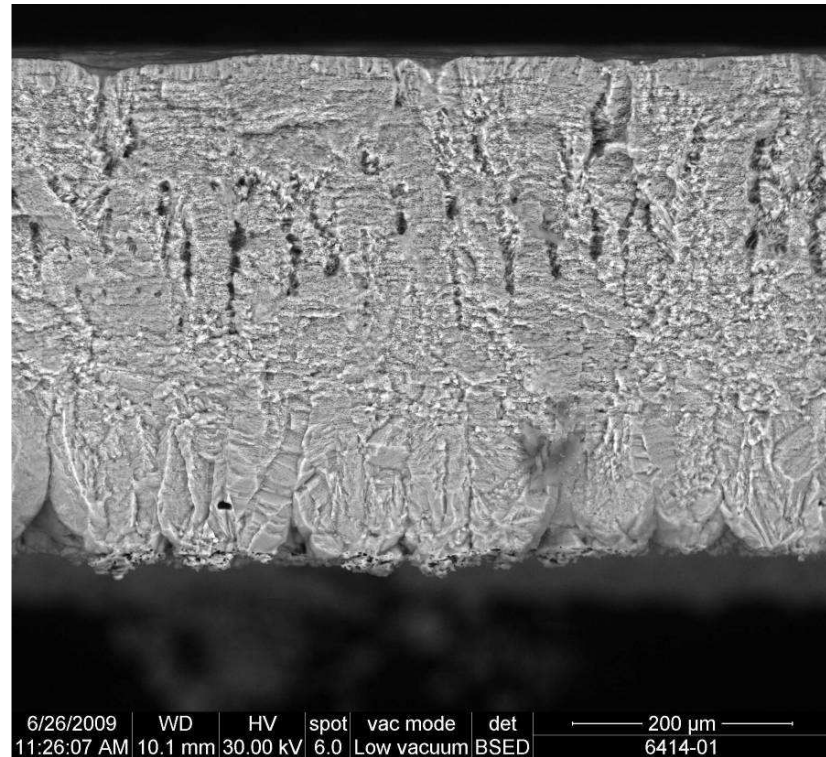


Imagen 3.11: Ultraestructura de la cáscara de un huevo de Cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) muy similar a la de las Falconiformes de tamaño mediano y grande.

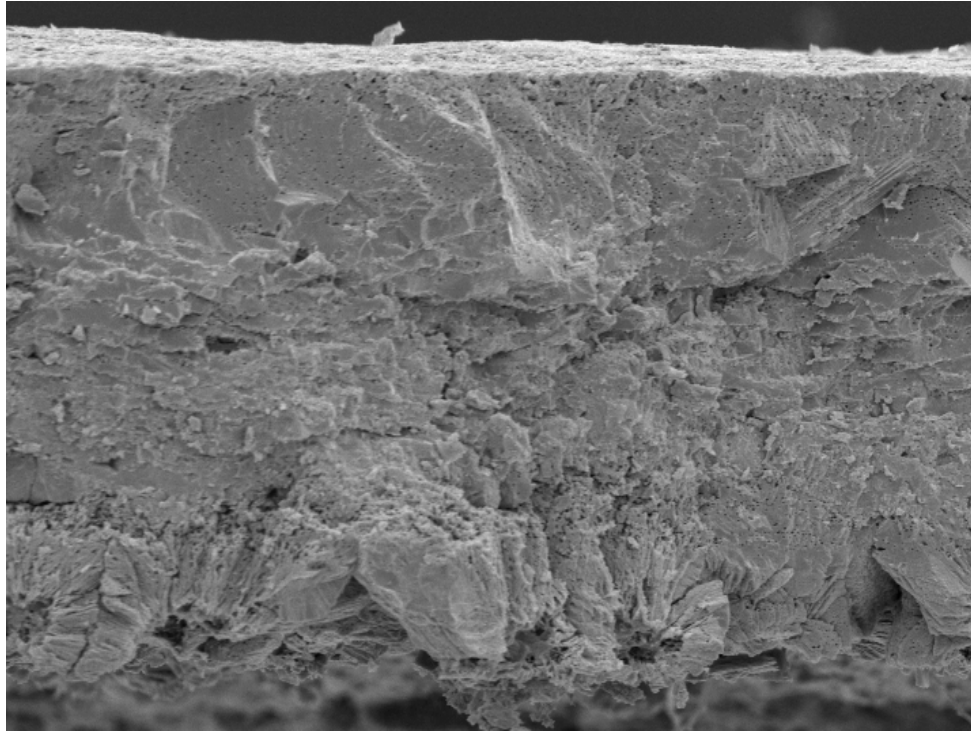


Imagen 3.12: Ultraestructura de la cáscara de un huevo de Cernícalo primilla (*Falco naumanni*). A pesar de ser una Falconiforme de pequeño tamaño, la cáscara tiene la misma ultraestructura que otras falconiformes.

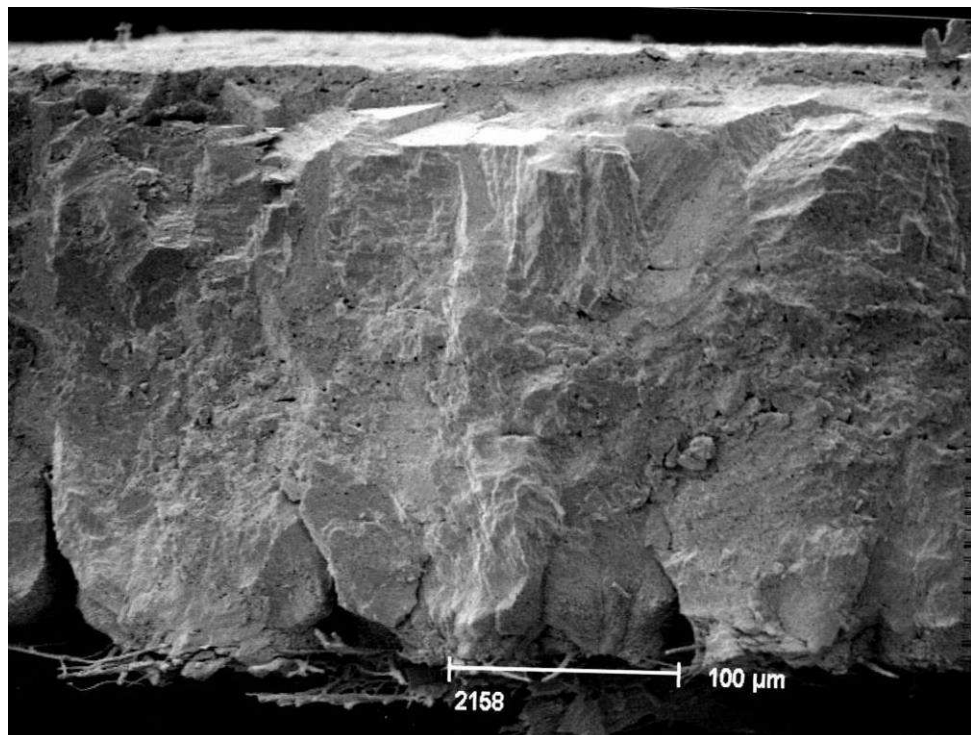


Imagen 3.13: Ultraestructura de la cáscara de un huevo de Halcón peregrino (*Falco peregrinus*) mostrando lo que podría parecer una capa cristalina superficial, aunque en realidad se trate de la capa reticular.

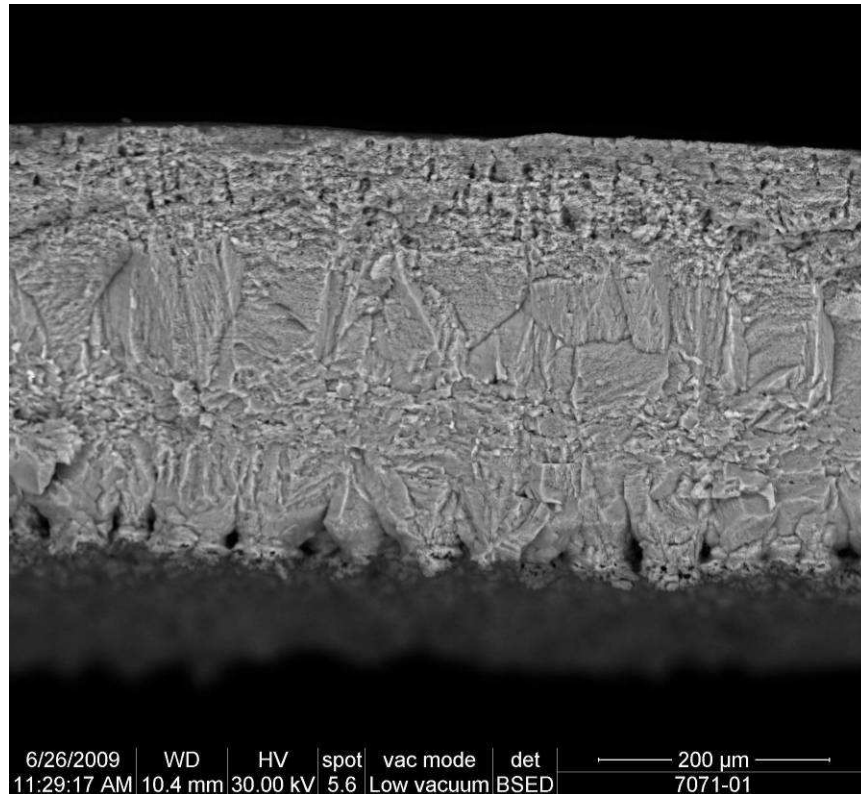


Imagen 3.14: Ultraestructura de la cáscara de un huevo de Azor (*Accipiter gentilis*), Falconiforme de mayor tamaño, mostrando capa reticular o esponjosa externa.

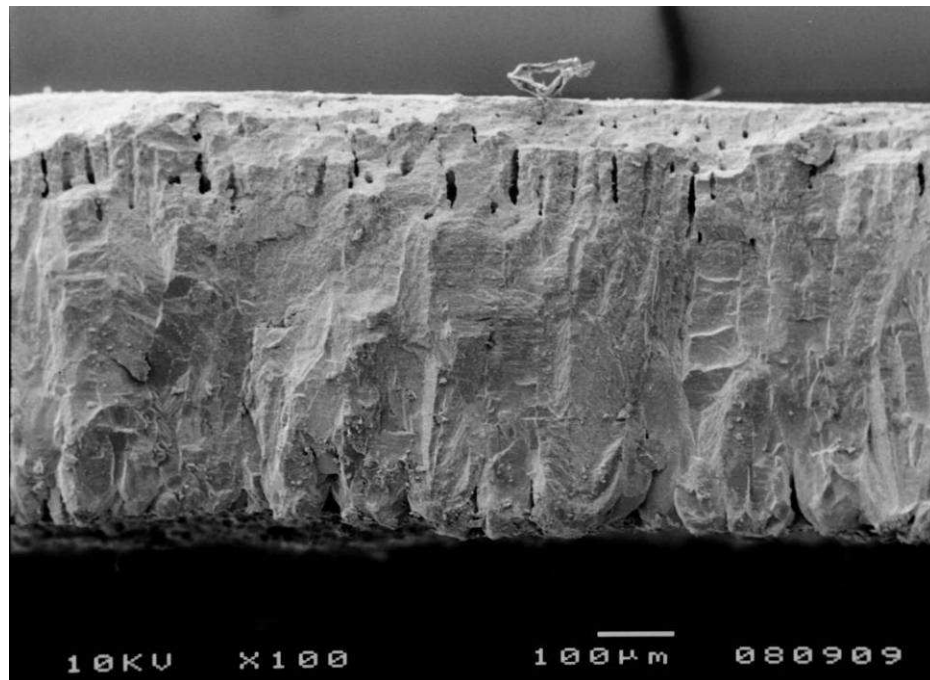


Imagen 3.15: Ultraestructura de la cáscara de un huevo de Águila imperial (*Aquila adalberti*) mostrando la capa reticular perfectamente definida y diferenciada de la capa palizada.

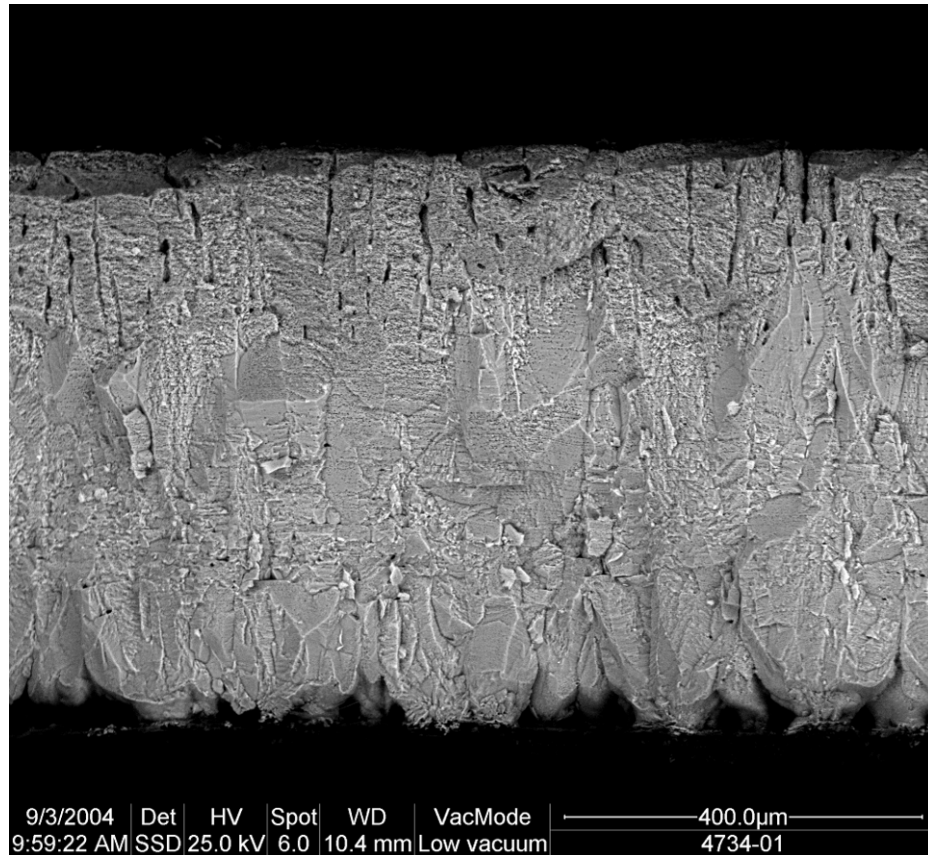


Imagen 3.16: Ultraestructura de la cáscara de un huevo de Buitre negro (*Aegypius monachus*), la Falconiforme de mayor tamaño de la Península Ibérica, mostrando la diferenciación de las tres capas en la cáscara calcificada.

3.2.1. Membranas testáceas.

Las membranas de la cáscara constituyen a la capa más interna de la cáscara del huevo y están formadas por un entramado fibrilar, no son una membrana en el sentido citológico (Bland, 1992). Las fibras tienen un diámetro de alrededor de 70 μ (Simkiss y Taylor, 1971) y consisten en un núcleo central cubierto por un material amorfo llamado "manto", compuesto mayoritariamente de mucopolisacáridos (Masshoff y Stolpmann, 1961; Bland, 1992). En el espacio entre el núcleo y el manto se encontrarían los escasos lípidos de la membrana de la cáscara (Candlish, 1972). Las membranas están formadas por una red de fibras orgánicas dispuestas sobre la albúmina, paralelas a la superficie de la cáscara y se encuentran organizadas en dos capas, una interna que está en contacto con la albúmina y otra externa, de mayor grosor que está situada entre la zona mineralizada de la cáscara y la membrana interna. Estas dos membranas están en íntimo contacto en toda su extensión, excepto a nivel del polo mas ancho, donde se encuentran separadas formando la cámara de aire (Simkiss, 1968; Wilburn y Simkiss, 1968; Parson, 1982).

La superficie interna de la membrana interna es lisa debido a la presencia de una capa delgada y homogénea (Simons y Wiertz, 1963), que impide el paso de la albúmina hacia los espacios entre las fibras. Bellairs y Boyde (1969) llamaron a esta capa, "*membrana limitante*". Estudios al microscópico electrónico sugieren que está compuesta

del mismo material que el manto de las fibras y se continúa con él (Simons y Wiertz, 1963; Bellairs y Boyde, 1969). La membrana limitante corresponde a la capa mas interior de la cáscara del huevo.

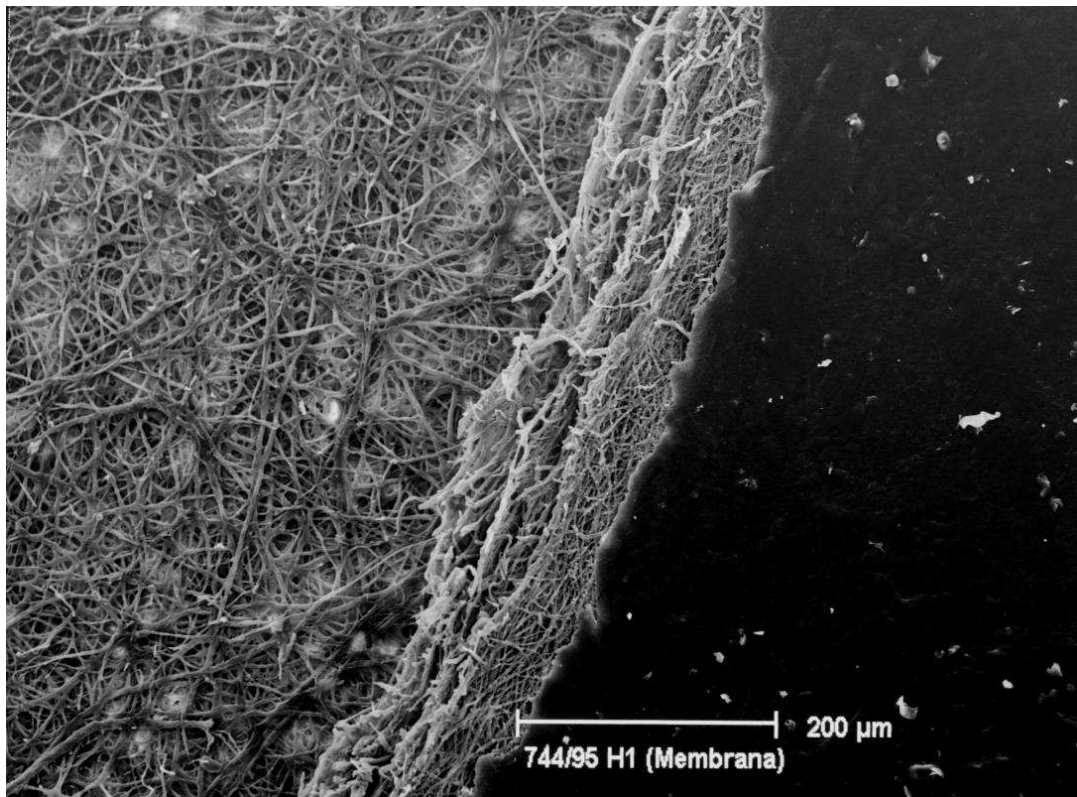


Imagen 3.17: Imagen ultraestructural de las dos membranas testáceas de un huevo de Quebrantahuesos. Se aprecia la membrana interna, izquierda, adherida a la cáscara y entre cuyas fibras se adivinan los conos basales, y la membrana externa, mas gruesa, compuesta de varias estratos de fibras entrelazadas.

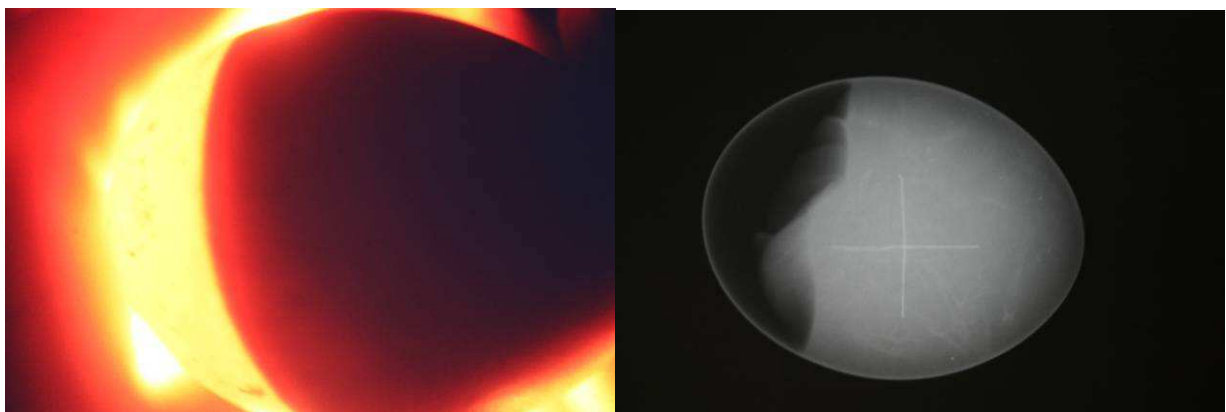


Imagen 3.18 (izda) y 3.19 (dcha): Imagen de un huevo de Quebrantahuesos visto a través del ovoscopio al final de la incubación y radiografía del mismo huevo. Se aprecia la formación de la cámara de aire en el polo ancho.

Las membranas externa e interna contribuyen también a la regulación del intercambio gaseoso durante el desarrollo embrionario (Ar et al., 1979; Ar y Rahn, 1980) y es donde se asientan los núcleos de cristalización a partir de los cuales la deposición ordenada de los cristales de calcita origina la formación de la cáscara mineralizada.

3.2.2. Capa mamilar.

La capa mamilar recibe este nombre por estar formada en su parte basal por unas estructuras semiesféricas llamadas "*conos basales*" (Simons, 1971; Schmidt, 1962; Becking, 1975; Tyler y Fowler, 1978; Bland, 1992). Esta capa se origina en la fase inicial de la calcificación de la cáscara a partir de núcleos de calcificación, los llamados "*centros de nucleación o núcleos mamilares*", que se asientan sobre la membrana limitante distribuidos de forma aleatoria, en los que se inicia la deposición radial de cristales de calcita (Tyler y Simkiss, 1958; Revén, 1970; Tyler, 1964; Becking, 1975; Tyler y Fowler, 1978). El crecimiento competitivo de los cristales de calcita sobre estos núcleos primarios de calcificación, origina unas estructuras cónicas de morfología semiesférica, que en un principio crecen de forma aislada. Estas estructuras semiesféricas son los denominados "*conos basales*", en los que se conserva el núcleo del cono basal o núcleo mamilar como reminiscencia de los originales centros o núcleos de calcificación. Es a partir de este núcleo del cono donde el embrión obtiene el calcio necesario para su desarrollo y para los diferentes procesos metabólicos, originando un desgaste progresivo del cono conforme se produce la resorcpción de calcio y magnesio (Board, 1982; Bland, 1992).

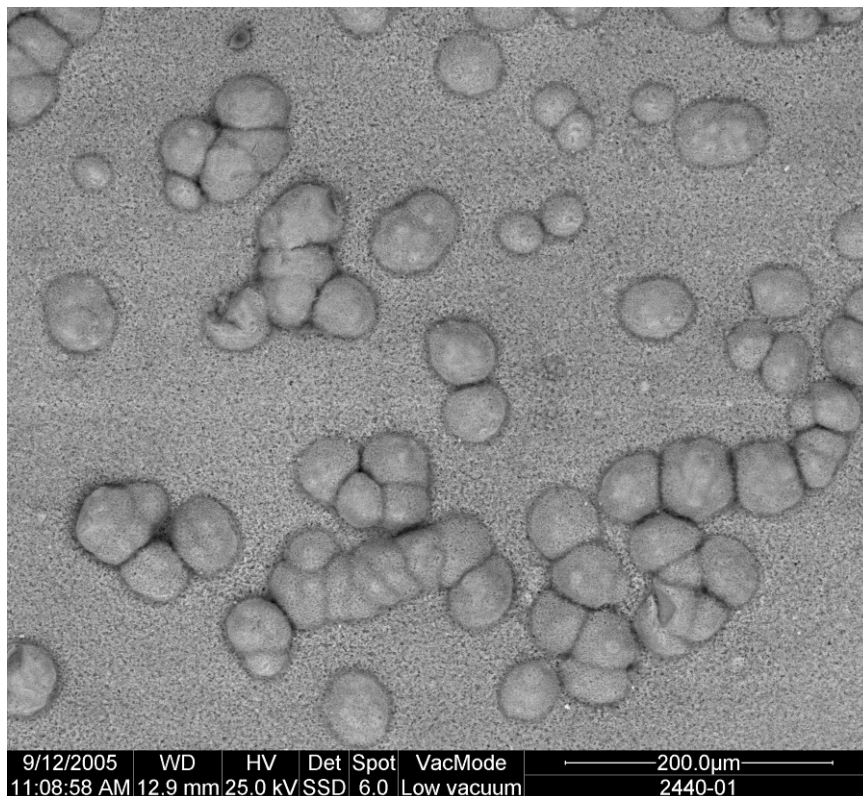


Imagen 3.20: Imagen ultraestructural de los núcleos de calcificación que se están formando sobre la membrana limitante en un huevo de Milano real (*Milvus milvus*). La muestra fue obtenida del oviducto de una hembra reproductora encontrada envenenada en el nido en la provincia de Segovia en 2005.

La morfología de los conos basales no es aleatoria sino que responde a la necesidad de ofrecer una fuente de calcio para el desarrollo embrionario sin producir paralelamente una merma en la dureza de la cáscara o una alteración significativa del intercambio gaseoso (Reven, 1970; Becking, 1975; Ar y Rahn, 1980; Board, 1982), ya que la reducción del espesor es insignificante como consecuencia de la movilización de calcio (Bunck et al., 1985; García-Ruiz, 1996; Balkan et al., 2006; Zimmermann y Hipfner, 2007). Sin embargo esta resorción de calcio determina un desgaste o erosión de los conos basales que nos permite, desde el punto de vista práctico, diferenciar si en el huevo ha habido desarrollo embrionario avanzado o no.

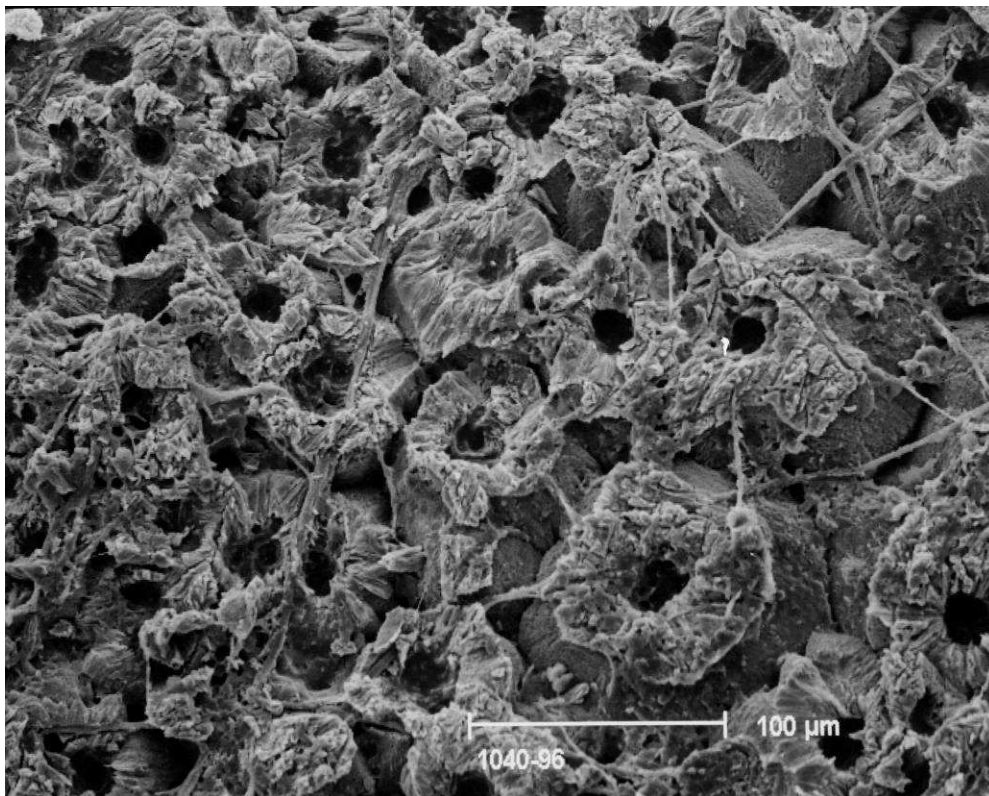


Imagen 3.21: Imagen ultraestructural de los conos basales de un huevo de Águila imperial colectado en el Parque Nacional de Doñana en 1996, donde se aprecian núcleos mamilares centrales y el desgaste de las paredes de los conos, denominada región de reserva de calcio por Dieckert et al. (1989).

El crecimiento en forma cónica de estos conos basales determina que los conos inicialmente aislados van aproximándose entre ellos hasta fusionarse (Revén, 1970; Becking, 1975; Mikhailov, 1991), originando la capa mamilar. Ésta se compone, por tanto, de los conos basales y una zona donde se pierde el contorno de éstos pero se mantiene la estructura cristalográfica de la calcita (Revén, 1970; Board, 1982; Mikhailov, 1991). Dieckert et al. (1989) distinguen dentro del cono basal una zona en contacto con las membranas de la cáscara, llamada región de reserva de calcio (CRA: "calcium reserve assembly"). La CRA es la zona del cono basal que sufre la descalcificación a partir de la segunda mitad del desarrollo del embrión, lo que demuestra su calidad de reservorio de calcio (Dieckert et al., 1993).

La estructura y la conformación de la capa mamilar son los factores determinantes de la solidez de la cáscara (Simons, 1971; Parsons, 1982). Existe una correlación entre la densidad de los conos basales (número de conos basales por cm^2) y la dureza de la cáscara (Fujii, 1974; Parsons, 1982; Balkan et al., 2006; Zimmermann y Hipfner, 2007).

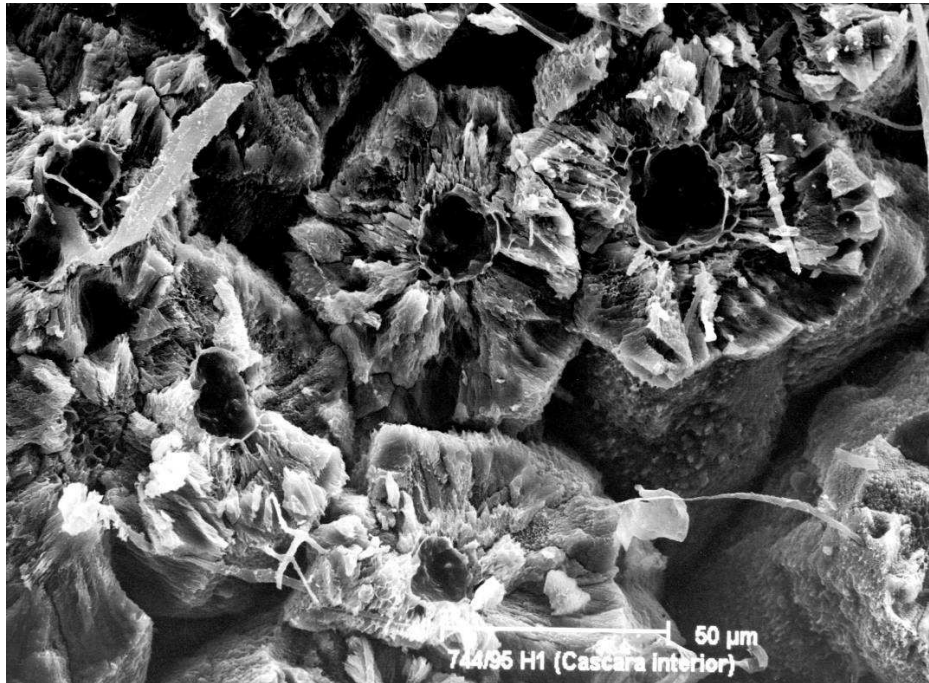


Imagen 3.22: Desgaste de los conos basales de un huevo de Quebrantahuesos incubado artificialmente a término. El huevo procedía de una puesta rescatada en Huesca en 1995.

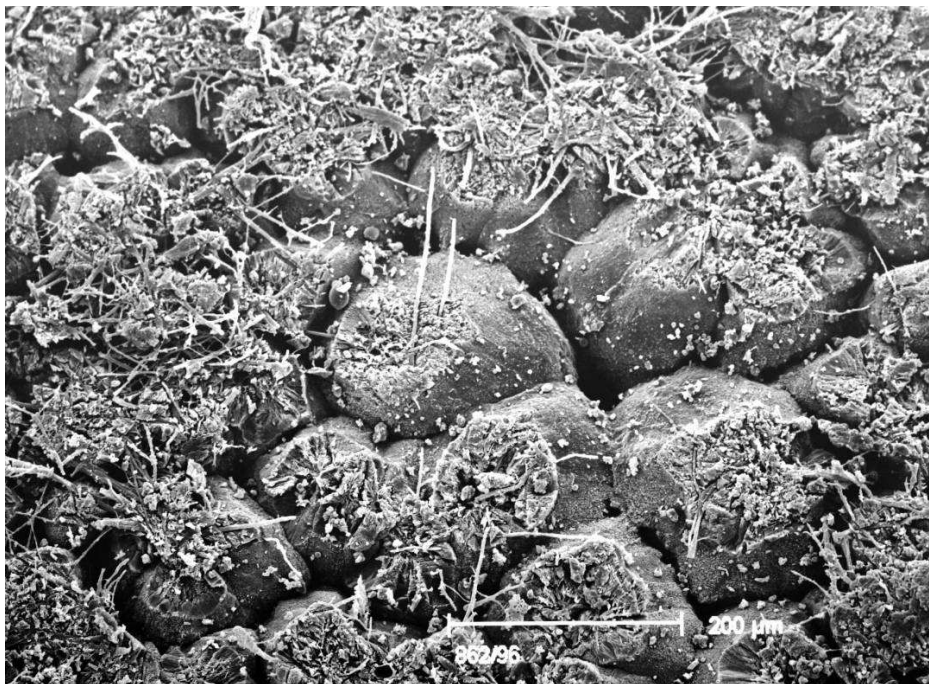


Imagen 3.23: Desgaste de los conos basales de un huevo de Quebrantahuesos de un nido de la provincia de Lleida de 1994 que fracasó en el último tercio de la incubación.

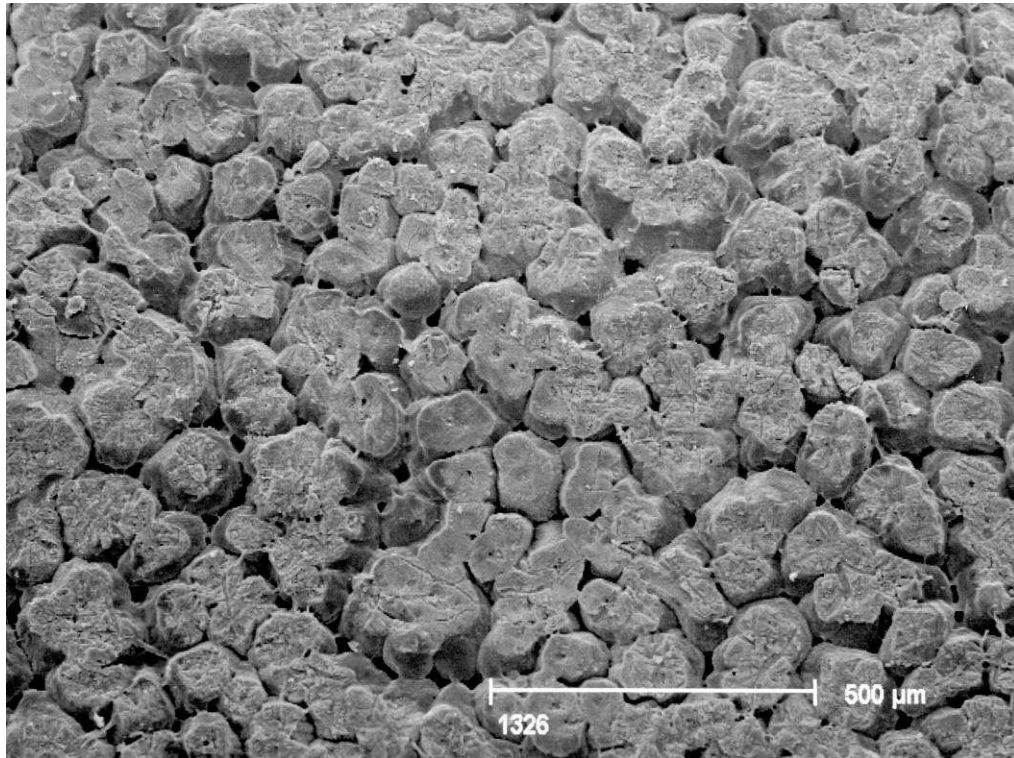


Imagen 3.24: Ausencia de desgaste de los conos basales de un huevo de *Águila imperial* colectado en el Parque Nacional de Doñana en 1997. El huevo era infértil.

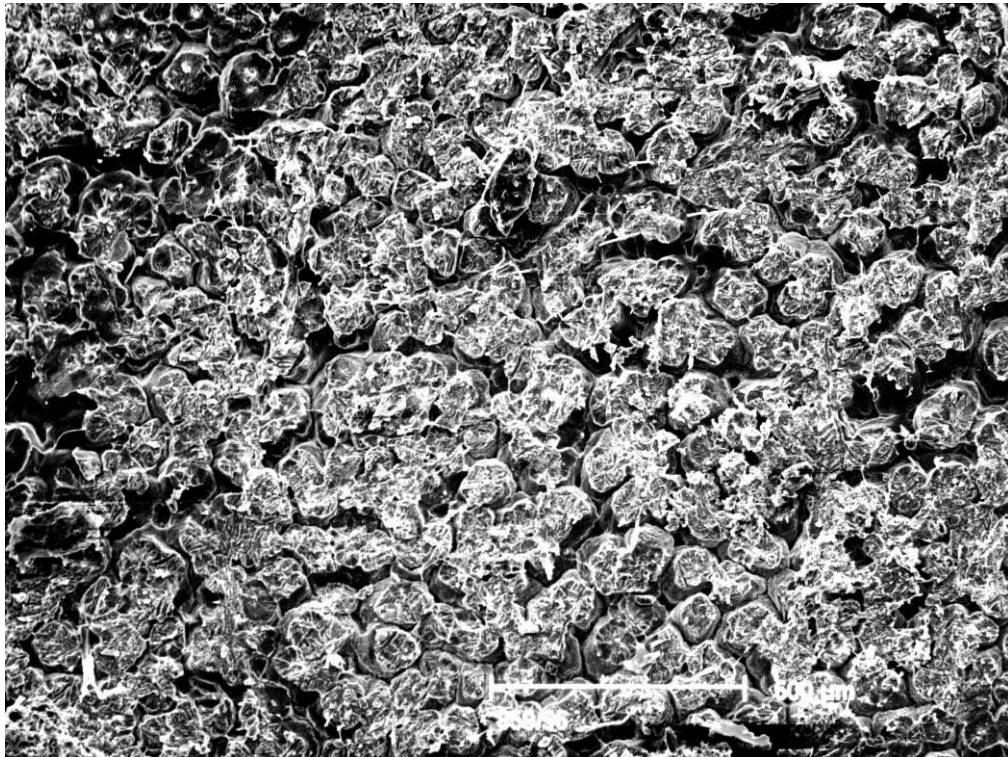


Imagen 3.25: Ausencia de desgaste de los conos basales en unos restos de cáscaras de Quebrantahuesos de un nido de Lleida en 1994 en los que no es posible determinar si era infértil o el fracaso se produjo en el inicio de la incubación.

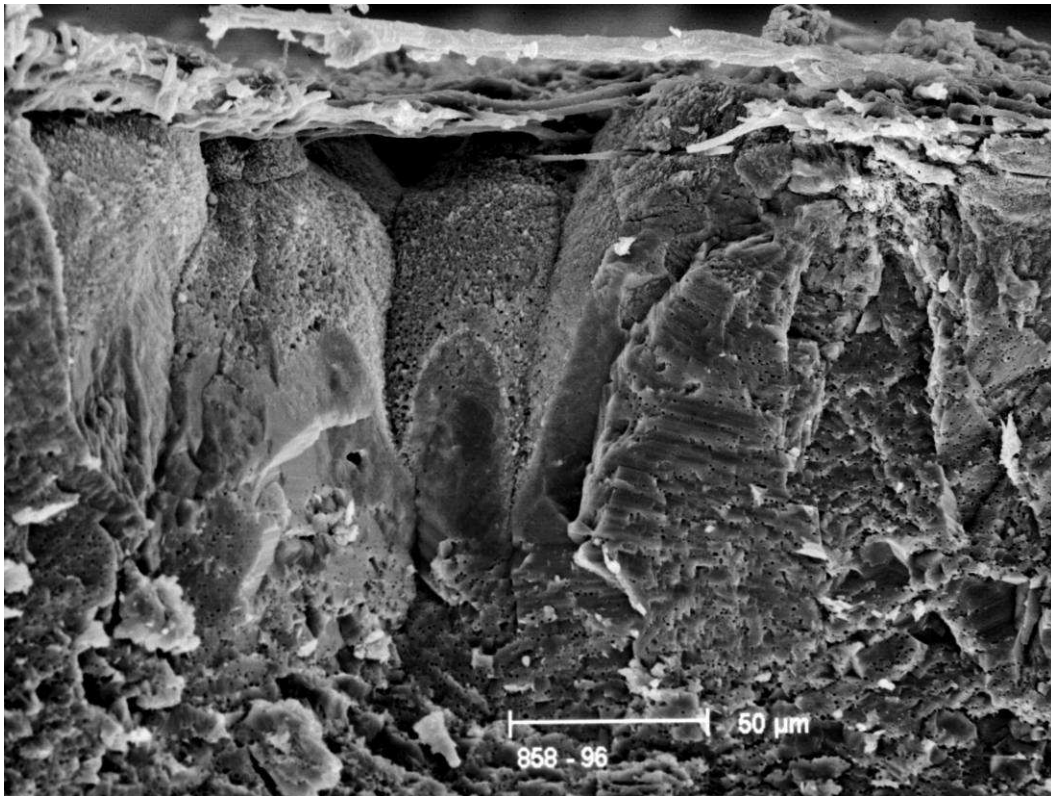


Imagen 3.26: Detalle de la imbricación de los conos basales con la membrana interna en un huevo de Quebrantahuesos de Huesca recogido en 1990.

3.2.3. Capa palizada.

La capa palizada es llamada así por la nueva orientación de los cristales de calcita, que a partir de la capa mamilar adoptan una disposición romboédrica, dando un aspecto a la capa de perfil de sierra (Becking, 1975; García-Ruiz, 1996) o columnar (Bland, 1992). Además, en esta capa aparecen los llamados "*microporos*", que en especies pequeñas llegan a ser muy numerosos y produciendo una capa palizada altamente vesicular, dándole un aspecto reticulado (Revén, 1970; Becking, 1975; Board, 1982; Bland, 1992). El límite entre la capa mamilar y la capa palizada no es siempre muy nítido, pero la diferente orientación de los cristales de calcita y la aparición de estos microporos contribuyen a su delimitación (Becking, 1975; Tullet y Board, 1977). La capa palizada es la mas gruesa de las tres capas de la cáscara (Becking, 1975;), representando alrededor de entre un 60 y un 70% del espesor total de la cáscara y es que la que en mayor medida contribuye a la propiedades mecánicas de ésta (Board, 1982; Bland, 1992; García-Ruiz, 1996).

Está compuesta por componentes orgánicos e inorgánicos en forma integrada. El componente inorgánico corresponde a carbonato de calcio en forma de calcita y el componente orgánico (matriz de la cáscara) es mayoritariamente proteico. Cuando la capa palizada se descalcifica con EDTA, se obtiene una fracción soluble (40%) y otra insoluble (60%). De la fracción soluble se ha obtenido ácido hialurónico (Heaney y Robinson, 1976) y algunas proteínas que presentan alta afinidad por calcio (Krampitz y Engels, 1974; Abatangelo et al., 1978; Hamm et al., 1979; Krampitz et al., 1980; Cortivo et al., 1982).

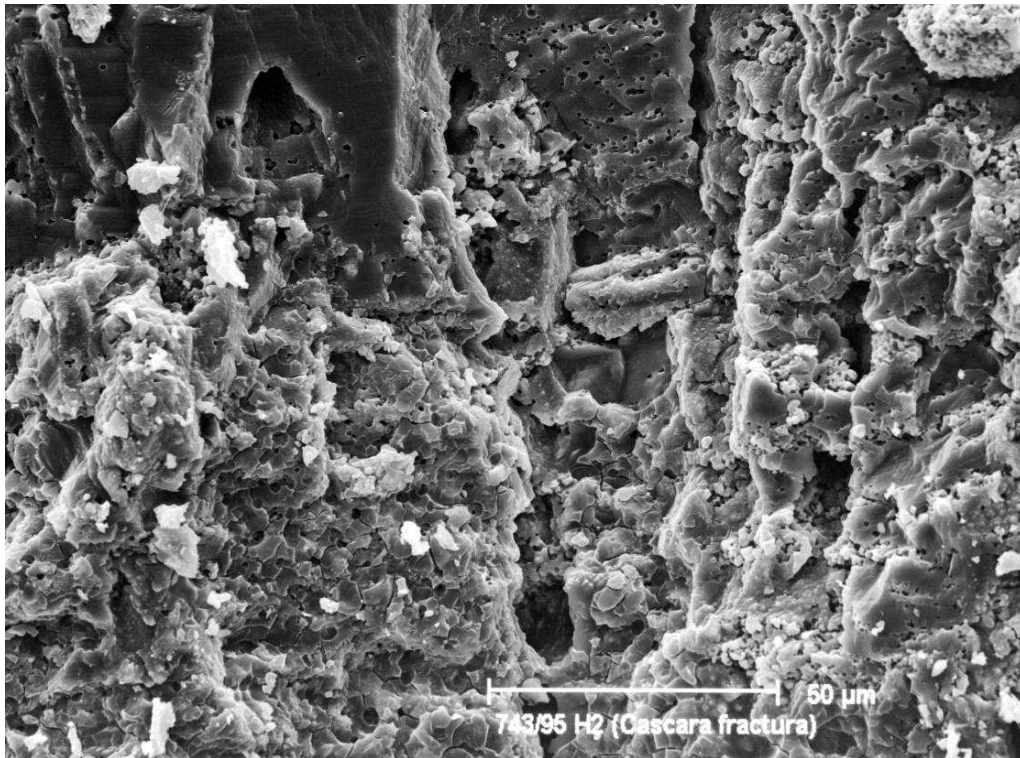


Imagen 3.27: Detalle de la transición entre las capas mamilar (abajo) y palizada en un huevo de Quebrantahuesos de Huesca recogido en 1995.

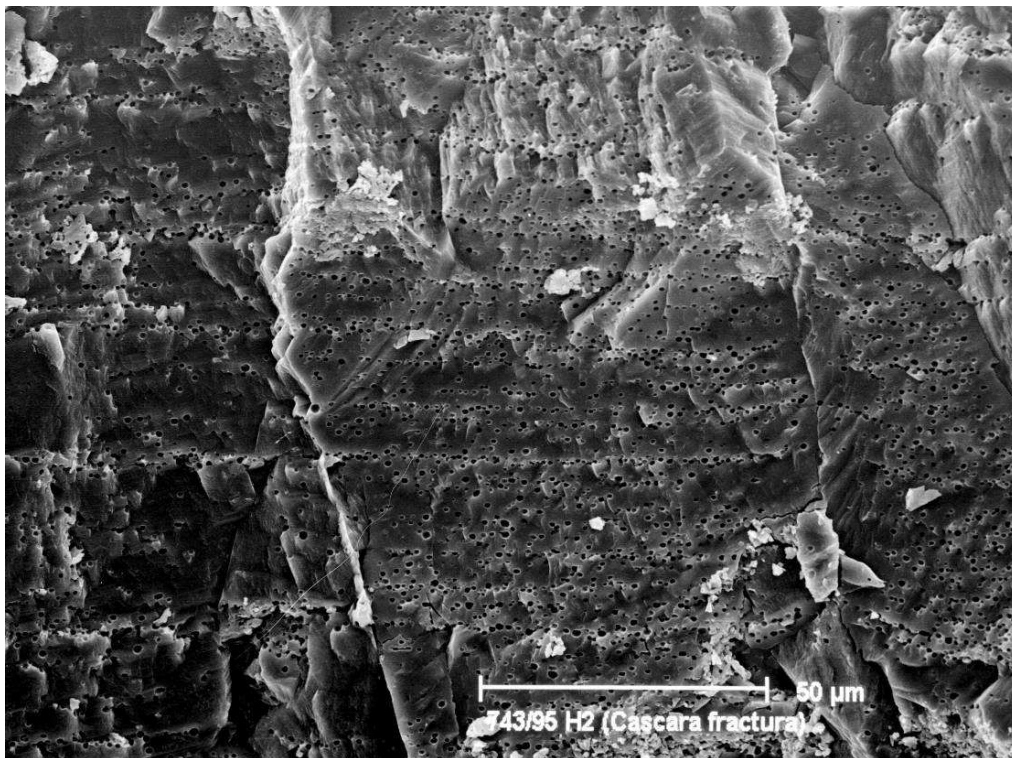


Imagen 3.28: Detalle del mismo huevo en el que se observan los numerosos microporos de la capa palizada.

Estas proteínas presentan abundantes grupos carboxílicos ionizados (residuos de aminoácidos como aspártico y glutámico) e incluso en algunas de ellas se ha detectado ácido γ -carboxiglutámico. Esta proteína que contiene ácido γ -carboxiglutámico ha sido denominada ovocalcina (Krampitz et al., 1980). Otros sistemas biológicos que se mineralizan como huesos, dientes y conchas de moluscos también poseen proteínas ricas en estos residuos, lo que sugiere que estos grupos carboxílicos ionizados son los principales responsables del ligamiento a los iones de calcio y por tanto facilitan la deposición de cristales cálcicos (Arias et al., 1991a). También ha sido descrita en la matriz la presencia de anhidrasa carbónica (Krampitz et al., 1974). Muchas de las proteínas de la cáscara son sintetizadas en el hígado y no en la glándula de la cáscara de oviducto (Eckert et al., 1986; Schade, 1987).

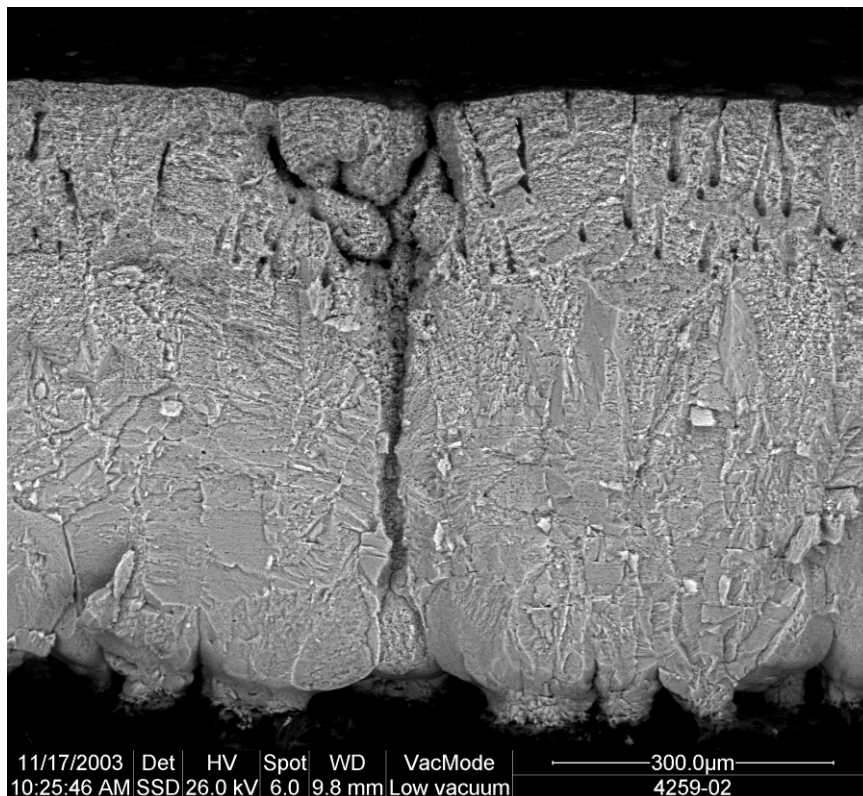


Imagen 3.29: Macroporo que atraviesa completamente la cáscara de un huevo de Buitre negro colectado en Madrid en 2006.

Tanto la parte mineral como la orgánica de la capa palizada están estructuradas en columnas entre las cuales se delimitan los macroporos de la cáscara. Estos macroporos consisten de una abertura en forma de embudo en el exterior del huevo, y de un canal único o un canal ramificado, dependiendo de la especie, que termina entre los conos basales (Becking, 1975; Board, 1982). Su superficie interna es irregular y en algunas especies (género *Ciconia*) presenta abundantes espículas. Un huevo de gallina presenta entre 7.000 a 17.000 poros (Tyler, 1953) y su densidad guarda una relación inversa con la mortalidad embrionaria (Peebles y Brake, 1985). Su función está directamente relacionada con el intercambio gaseoso, siendo la capa palizada la capa que ofrece mayor resistencia al paso de los gases (Pahanelli, 1980) y su estructura determina la conductividad gaseosa.

Esta permeabilidad a los gases va aumentando en algunas especies con el desarrollo embrionario (Kutchai y Steen, 1971).

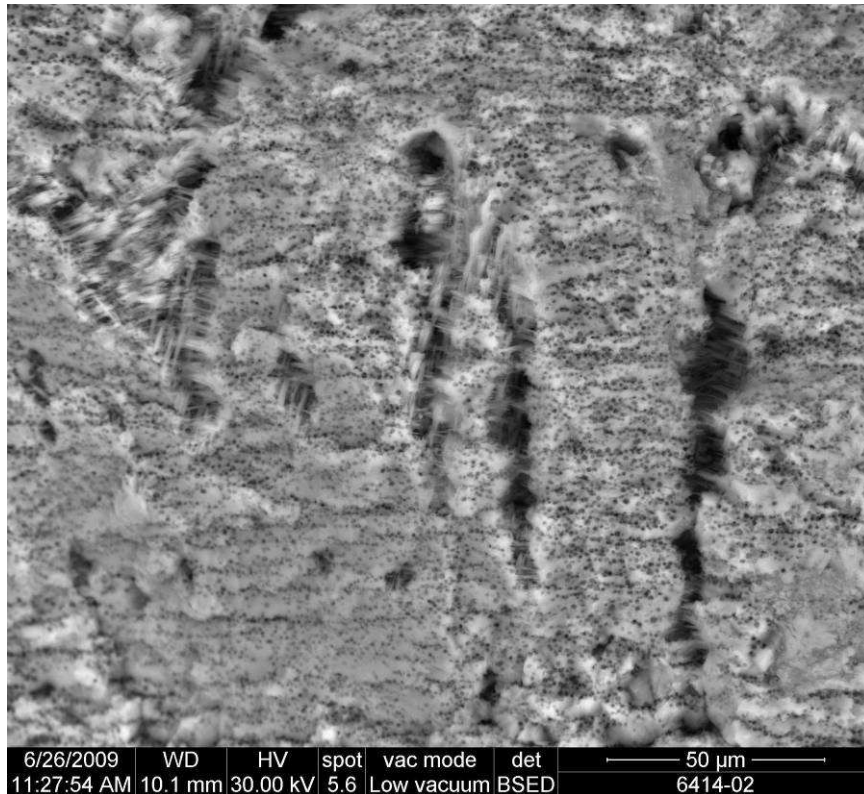


Imagen 3.30: Detalle del corte transversal de la cáscara de un huevo de Cigüeña blanca colectado en Lleida en 2009 en el que aprecia la presencia de espículas proyectadas hacia el interior de los macroporos.



Imagen 3.31: Detalle de las espículas en el interior de uno de los macroporos en un huevo de Cigüeña negra colectado en la provincia de Ávila en 1996.

3.2.4. Capa reticular o esponjosa.

Por último, la capa más externa, la capa reticular, descrita como tal por primera vez por Board (1982) no es reconocida por todos los autores. Esta capa tiene un aspecto esponjoso (de hecho algunos autores se refieren a ella como capa esponjosa) debido al desarrollo de un extenso sistema laberíntico de mesoporos, poros de mayor diámetro que los microporos pero sin alcanzar el calibre de los macroporos que atraviesan la cáscara, y que discurren casi perpendiculares o ligeramente oblicuos a la superficie externa de la cáscara (Tullet y Board, 1977). El sistema de mesoporos está interconectado con los microporos y se abren al exterior del huevo (Tullet, 1984; García-Ruiz, 1996).

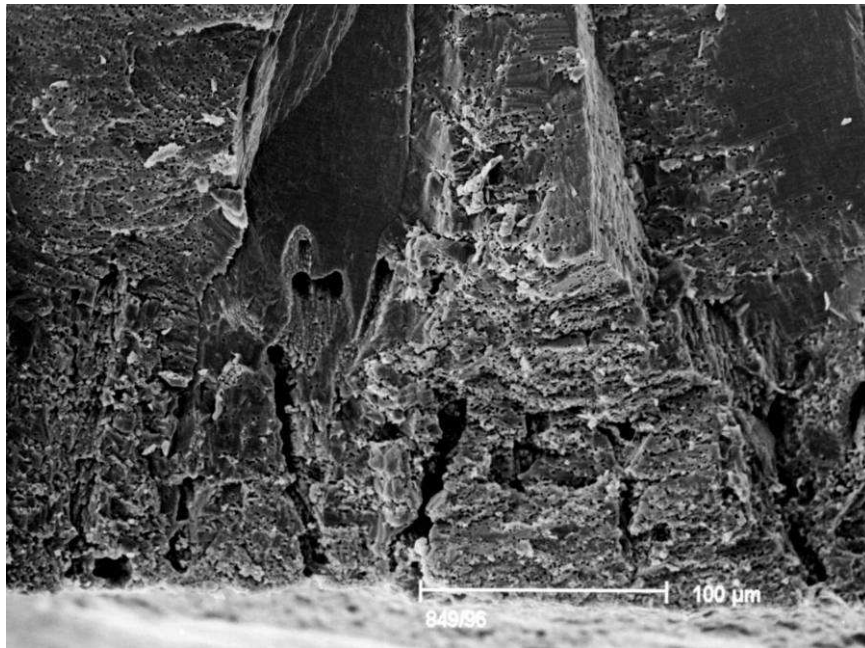


Imagen 3.32: *Detalle de la capa mamilar de un huevo de Quebrantahuesos colectado en Huesca en 1992. Se aprecia la pérdida de estructura cristalina y la presencia de una intrincada red de mesoporos.*

La presencia de esta capa depende de la especie. Ha sido descrita en todas las Falconiformes (Tyler, 1966, Cooke, 1979; Board, 1982) con independencia del tamaño, estando presentes en especies como el Cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) o el Cernícalo primilla. Diversos autores consideran que las aves de pequeño tamaño presentan una cáscara "incompleta", es decir, carente de la tercera capa externa (Mikhailov, 1997; Gosler et al., 2005).

En su defecto, consiguen compensar la ausencia de esta capa y las funciones que desarrolla durante la incubación con la presencia de la capa cristalina superficial, de la que carecen los huevos de las aves de mayor tamaño (Mikhailov, 1997), y la presencia de porfirinas (Fox, 1976; Gosler et al., 2005). Con estas últimas, consiguen compensar la reducción del espesor de la cáscara y conservar la correcta permeabilidad de la cáscara a los gases y el vapor de agua, sin que sea necesaria una mayor deposición de calcio (Gosler et al., 2005).

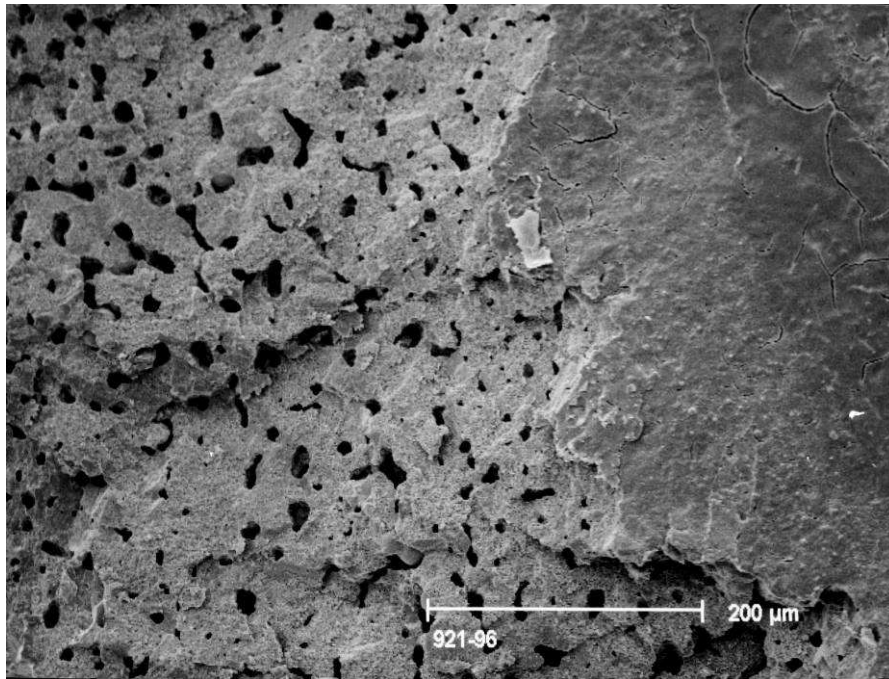


Imagen 3.33: Corte oblicuo a través de la capa reticular en un huevo de Águila imperial colectado en Madrid en 1996. Se observa el entramado de meso y microporos que le dan el aspecto esponjoso.

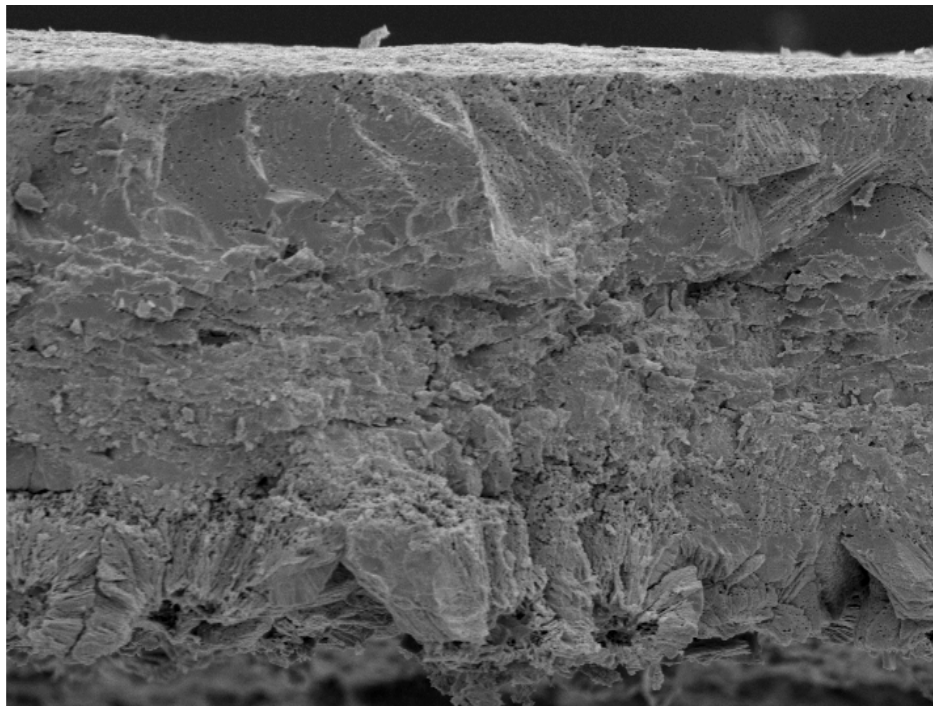


Imagen 3.34: Corte transversal de la cáscara de un huevo de Cernícalo primilla en el que se podría considerar la presencia de una capa cristalina superficial, aunque en realidad carece de esta y tiene capa reticular.

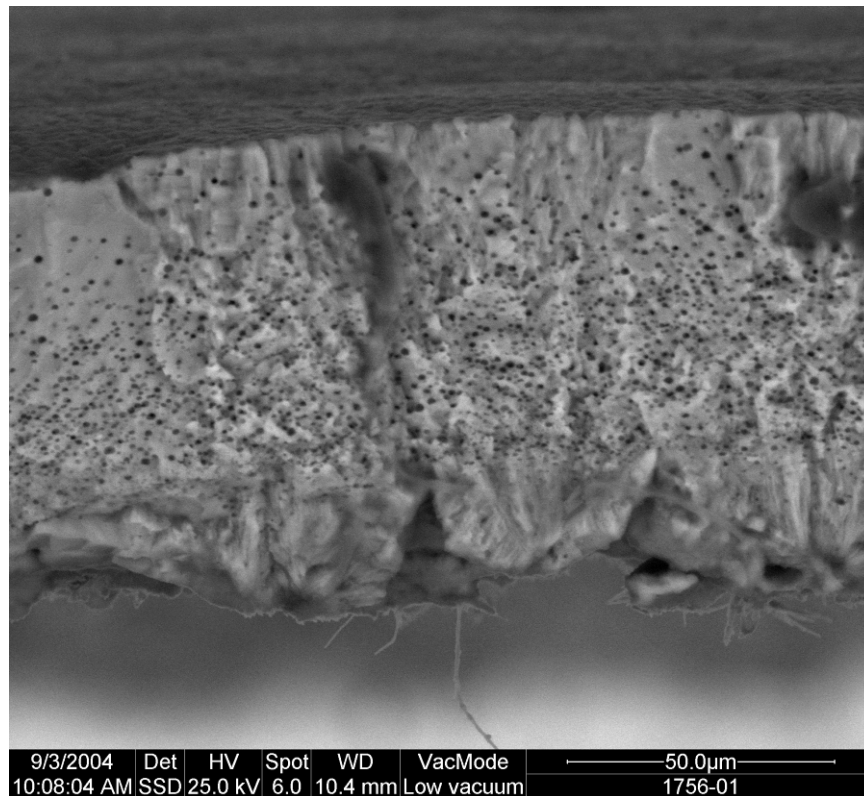


Imagen 3.35: Corte transversal de la cáscara de un huevo de perdiz roja, con ausencia de capa reticular y organización cristalina superficial.

Los mesoporos se distribuyen perpendiculares a la superficie de la cáscara y está rellenos de una matriz orgánica (Tyler, 1966). Cooke (1979) denominó a esta capa "*capa resistente superficial*" por la resistencia que presentaba a la digestión con ácido. Esta resistencia es debida a la presencia de una matriz orgánica mas abundante que en otras capas y que constituye la parte orgánica del sistema reticular de mesoporos. Board (1982) la denominó "*capa reticular*" por la disposición de los mesoporos perpendiculares a la superficie, denominación mas aceptada en la actualidad.

3.2.5. Capa cristalina superficial.

En algunas especies, toda la estructura mineralizada termina en una capa cristalina, de espesor variable, y que presenta los cristales orientados perpendicularmente (Tyler 1969). Esta capa es la reconocida por algunos autores como la capa cristalina superficial (Tyler 1966; Lack 1968; Board 1981; Cooke 1989; Bland 1992). Como se ha descrito antes, es característica de las aves de pequeño tamaño que carecen de capa reticular y se considera que estas especies presentan una cáscara incompleta.

Se considera que las aves pequeñas tiene escasa capacidad de obtener calcio, incluso para la oviposición (Mikhailov, 1997), por lo que este déficit determina la necesidad de producir una cáscara mas fina, pero con similar dureza y permeabilidad (Solomon, 1997; Gosler et al., 2005). Por ello presentan una capa exterior cristalizada que le confiere mas dureza (Tyler, 1966) así como una capa palizada altamente vesicular, lo que les permite deponer menos calcio para formar la cáscara (Solomon, 1997).

La superficie externa de la cáscara no es lisa, sino que presenta ondulaciones (Tyler 1966), más pronunciados cuanto mayor es el huevo, y cuya misión es el impedir que se ocluyan los poros (Tyler 1966; Becking 1975; Tullet 1975; Tyler & Fowler 1978).

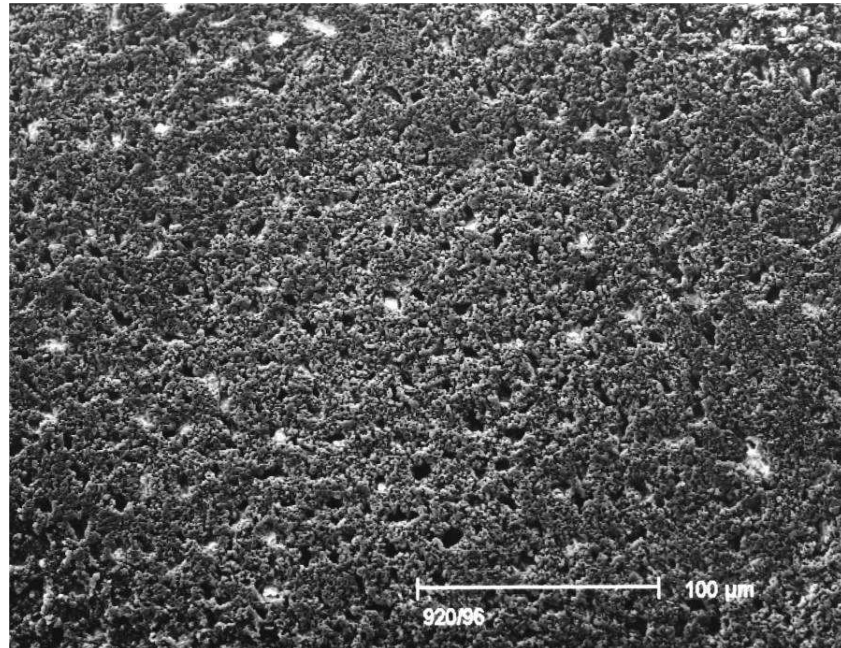


Imagen 3.36: Superficie externa de un huevo de Águila imperial procedente de Madrid, colectado en 1996 en la que se aprecian numerosos poros. No todos atraviesan la cáscara.

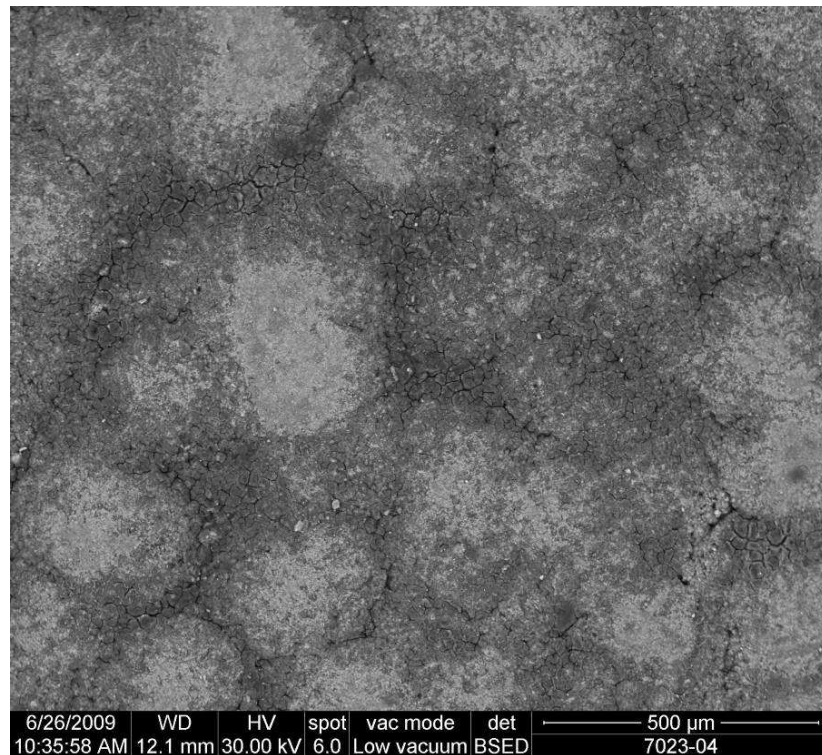


Imagen 3.37: Superficie externa de un huevo de Quebrantahuesos de Lleida colectado en 2009 en el que se observa la presencia de valles y mesetas.

3.2.6. Cutícula externa.

La cutícula externa es una fina capa orgánica de escaso espesor (normalmente entre 1 y 10 μ) compuesta principalmente de proteínas, grasas y polisacáridos, principalmente mucina (Simons y Wiertz, 1966; Revén, 1970; Board, 1982;) cuya misión principal es la ofrecer una barrera para impedir la colonización bacteriana. Esta cutícula se pierde con facilidad en las muestras de cierta antigüedad o sometidas a procesos de lavado. En algunas especies, esta capa es de naturaleza vesicular y está formada por proyecciones globulares compuestas de fosfato cálcico y algo más ricas en azufre que la cutícula normal (Board 1981; González e Hiraldo, 1988). En ella se encuentran los pigmentos (porfirinas) responsables de la coloración de la cáscara (Arias et al., 1991a). Al examinarla al microscopio electrónico de barrido la cutícula muchas veces muestra fisuras, con aspecto de barro seco, producto de la deshidratación y la oxidación de los grupos sulfidrilo de las proteínas presentes (Arias et al., 1991b).

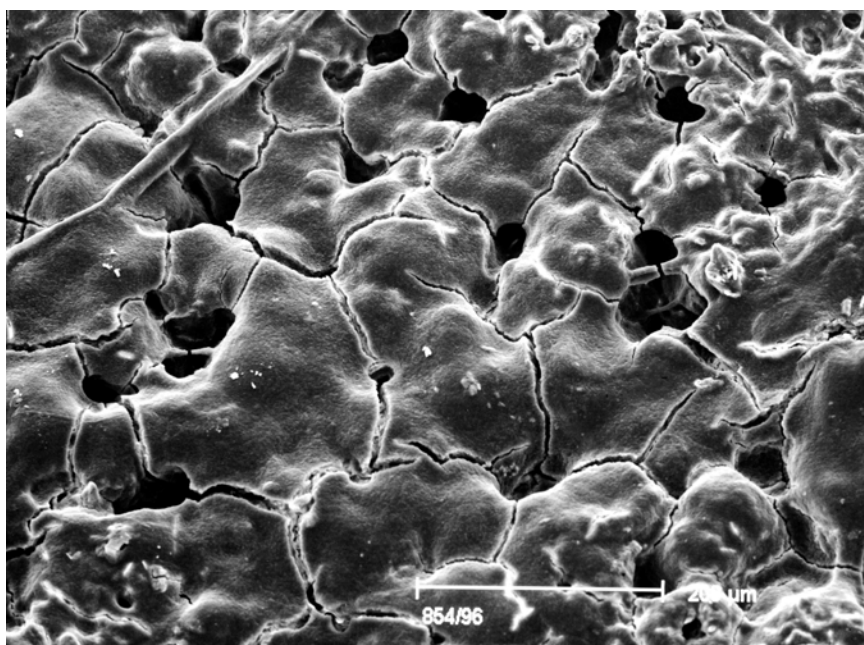


Imagen 3.38: Imagen al microscopio electrónico de barrido de la cutícula externa de un huevo de Quebrantahuesos de la provincia de Huesca de 1992 donde se aprecia la apertura de los poros y el resquebrajamiento debido a la deshidratación de la muestra.

La cutícula tiene una estructura vesicular (Simons, 1971) y evita la colonización bacteriana, aunque también protege al huevo de la pérdida excesiva de agua y favorecer el intercambio de gases por un mecanismo que depende de la humedad ambiental (Arias et al., 1991b). Por otra parte es la responsable de terminar el depósito de calcio en la capa en empalizada y se deposita inmediatamente antes de la puesta (Nys et al., 1999). La cutícula posee una alta conductancia para los gases comparada con la de las capas calcificadas (Pagnelli, 1980).

En algunas cáscaras la cutícula se encuentra formada por numerosas vesículas y adquiere un cierto espesor. Algunos autores (McFarland et al., 1971; Erbén y Krampitz, 1972; Peakall et al., 1973; Fox, 1976; González e Hiraldo, 1988) consideran que estas proyecciones globulares son patológicas y se deben a una disrupción de la cutícula de la

cáscara debido al efecto de contaminantes organoclorados. Bland (1992) las describe en huevos de Águila calva altamente contaminados con DDE. Sin embargo Garret (1973) considera que estas esferulitas se forman al finalizar prematuramente la formación de la cutícula y no las considera patológicas al no encontrar relación con los niveles de DDE. Se han encontrado en huevos de Halcón peregrino contaminados con DDE, pero también en huevos no contaminados y viables de Cigüeña negra, Halcón peregrino, Águila imperial e incluso Quebrantahuesos (Observación personal).

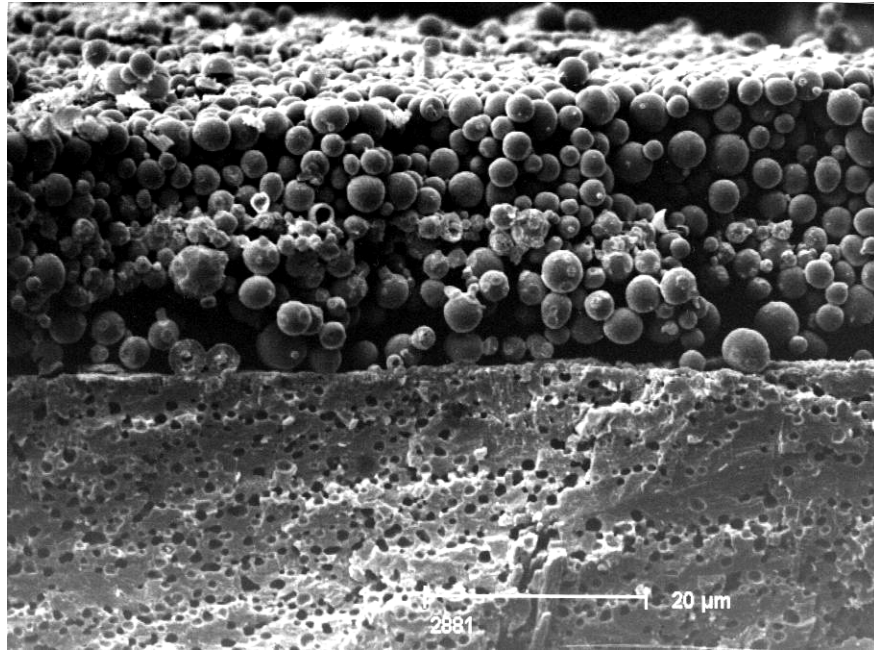


Imagen 3.38: Proyecciones globulares (esferulitas) en la cutícula externa de un huevo viable de Cigüeña negra de Ávila colectado en 2001.

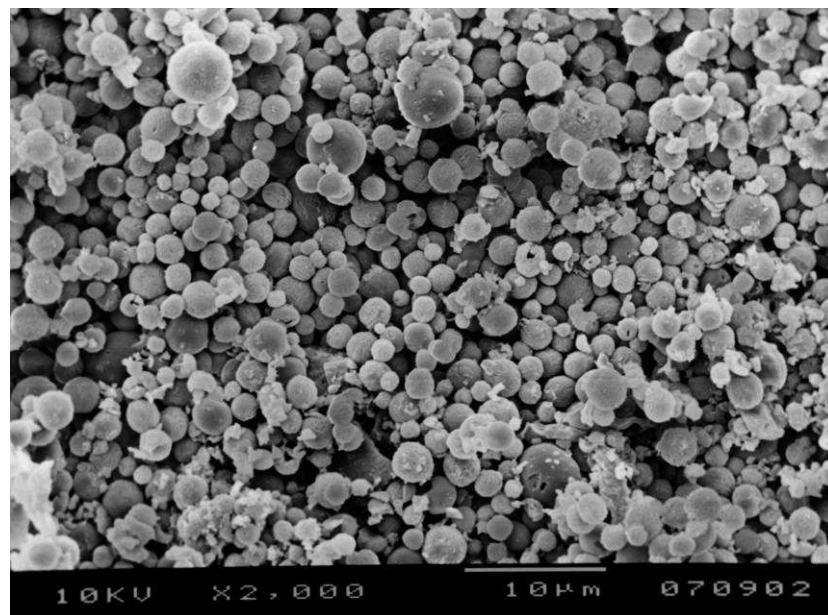


Imagen 3.39: Proyecciones globulares (esferulitas) en la cutícula externa de un huevo viable de Halcón peregrino de Madrid colectado en 1998.

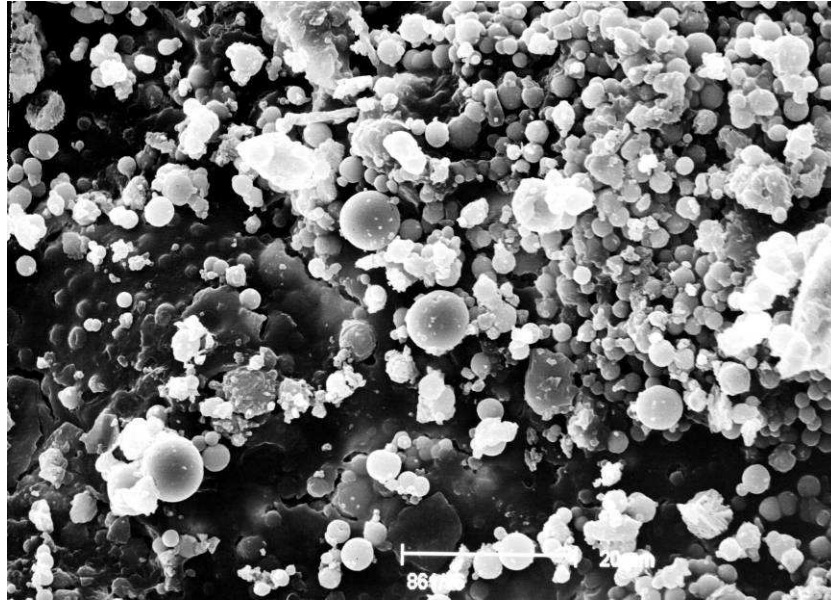


Imagen 3.40: Proyecciones globulares (esferulitas) en la cutícula externa de un huevo viable de Quebrantahuesos de Lleida colectado en 1994.

3.2.7. El sistema de poros.

Además de estas capas, en la cáscara existen unas estructuras que contribuyen también a la porosidad y permeabilidad en el intercambio gaseoso (Tyler, 1966; Rahn et al., 1974; Board, 1982). Son los poros, de los que se han descrito varios tipos, en función de su morfología y tamaño, y con funciones muy diversas (Lack, 1968; Tullet, 1975; Becking 1975; Tyler y Fowler, 1978; Board, 1982). Así se distinguen tres tipos de poros, clasificados en función de su diámetro: macroporos, mesoporos y microporos (García-Ruiz, 1996). El sistema poroso tiene una variación considerable en la cáscara de diferentes especies (Board, 1980).



Imagen 3.41: Apertura de los macroporos en la cara interna de la cáscara entre los conos basales en un huevo de Quebrantahuesos.

Los mesoporos están confinados a la capa reticular, la más externa, y constituyen un red o laberinto con interconexiones con los otros dos tipos de poros (Tyler, 1966; García-Ruiz, 1996). Discurren de forma perpendicular a la capa reticular, aunque también de forma oblicua, y se abren al exterior de la cáscara (Tyler, 1966). Presentan una fracción orgánica disuelta en líquido cuya función es la de actuar como termoaislante al amortiguar los cambios bruscos de temperatura y de mantener la humedad del huevo (García-Ruiz, 1996).

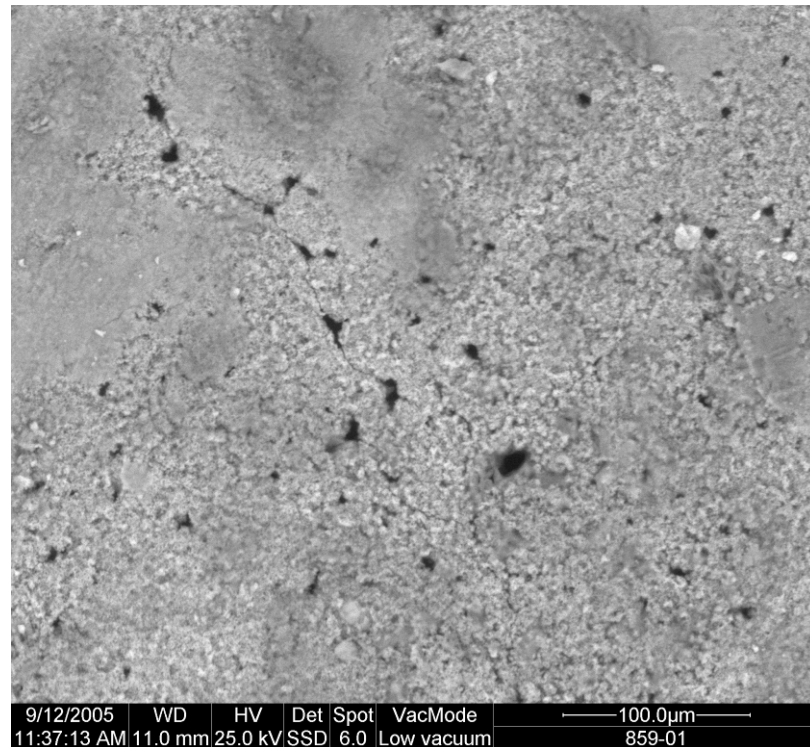


Imagen 3.42: Apertura de los macroporos en la cara externa de la cáscara en un huevo de Quebrantahuesos una vez limpia con NaOH.

Los poros de mayor diámetro, los macroporos, atraviesan toda la cáscara (Tullet y Board, 1977; Tullet, 1984) y son los principales responsables del intercambio gaseoso a través de la cáscara (Tyler, 1966; Becking 1975; Tyler & Fowler, 1978). Se originan en la confluencia de varios conos basales (Tullet, 1975; Tyler y Fowler, 1978), en la parte mas interna de la cáscara entre columnas vecinas, atraviesan todo su espesor y se abren en la superficie (Tullet, 1975; García-Ruiz 1996). La morfología de estos macroporos varía en función del tamaño del huevo desde tubulares simples hasta ramificados (Tyler, 1966; Tullet y Board, 1977; Tullet, 1984) y tiene una sección alargada con ensanchamientos locales. La formación de los macroporos tiene lugar durante la calcificación de la cáscara como consecuencia del flujo de fluidos desde el útero hasta el interior del huevo, durante la formación del albúmen (Tyler y Fowler, 1978; Carey, 1980). En algunas especies, en la apertura al exterior del huevo tienen forma de embudo (Tyler, 1966; Board, 1980).

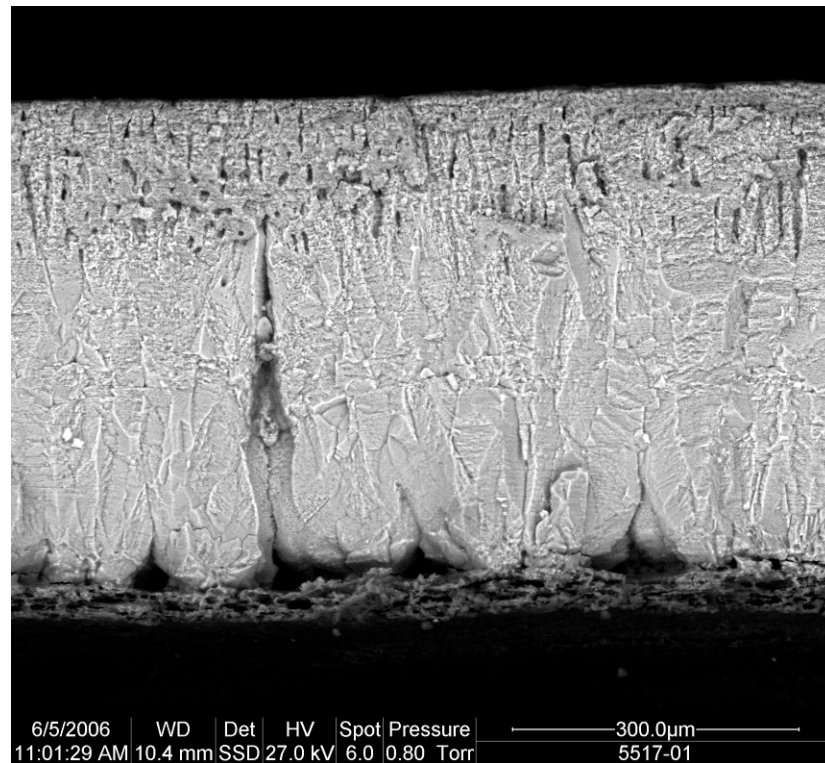


Imagen 3.43: Macroporo en un huevo de Águila imperial.

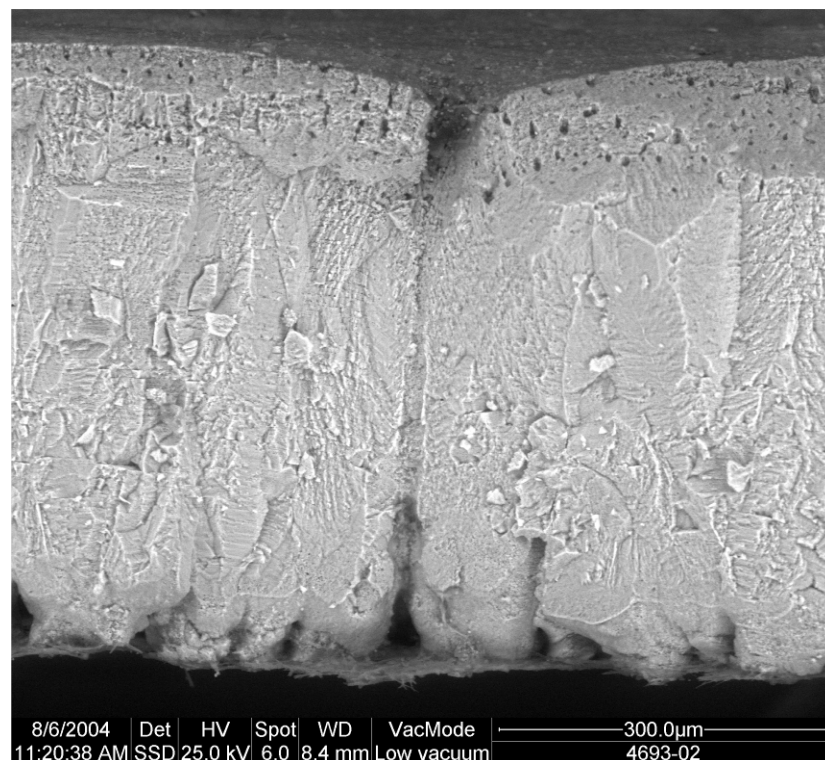


Imagen 3.44: Macroporo en un huevo de Buitre negro con el inicio en forma de embudo.

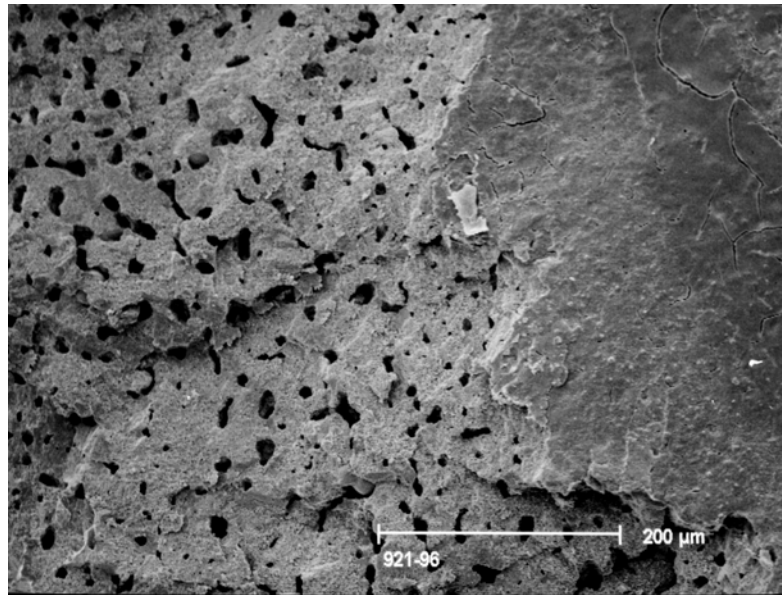


Imagen 3.45: Meso y microporos en la capa reticular de un huevo de Águila imperial colectado en Madrid en 1996.

Por último, los microporos, también llamados poros vesiculares (Becking, 1975), están presentes en las capas mamilar y palizada, aunque su número, morfología y distribución varía entre las capas y dentro de éstas (Board, 1980; García-Ruiz, 1996). No constituyen una red propiamente dicha ya que no hay conexión entre muchos de ellos y, a diferencia de la capa palizada, en la capa reticular presentan una fracción orgánica disuelta en líquido, al igual que los mesoporos (Tyler y Fowler, 1978; Carey, 1980; García-Ruiz, 1996).

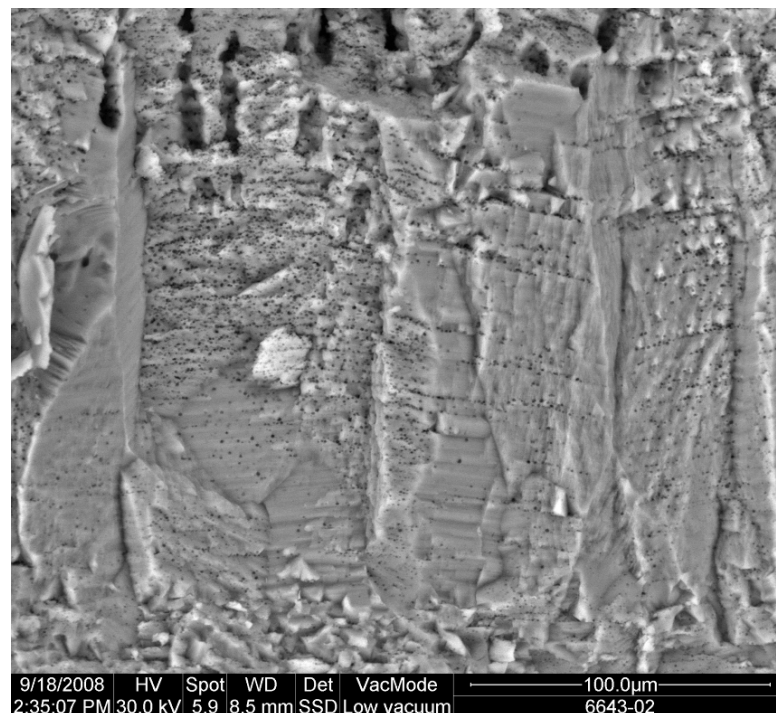


Imagen 3.46: Microporos en la capa palizada de un huevo de Buitre leonado.

3.2.8. Variaciones fisiológicas en la ultraestructura de la cáscara.

La cáscara no presenta una ultraestructura homogénea en todo el huevo (Nys et al., 1999) y en algunas especies tampoco durante toda la incubación (Simkiss, 1961). En general, en todas las aves la cáscara es mas gruesa en el polo fino y mas delgada en el grueso (Soliman et al., 1994; Balkan et al., 2006) para facilitar el nacimiento del pollo, ya que en el polo ancho es donde se forma la cámara de aire y no interviene en el intercambio gaseoso al final de la incubación (Massaro y Davis, 2005). En el polo ancho, la capa reticular se organiza en protuberancias externas llamadas "mamelones" (García-Ruiz, 1996). Las diferencias en espesor y estructura entre el polo fino y el ecuador del huevo no son significativas (Balkan et al., 2006).

En anátidas, además, se ha encontrado que la conductividad de la cáscara aumenta durante la incubación por un aumento en el número de poros (Massaro y Davis, 2004; Balkan et al., 2006). Sin embargo, estos cambios no han sido documentados en Falconiformes (Tyler, 1966; Bland, 1992). Por último, el aumento del espesor de la cáscara de los huevos con la edad de la hembra parece ser generalizado en todas las familias aviares (Massaro y Davis 2005; Balkan et al., 2006) a excepción de las aves de producción (Solomon, 1997). El aumento del espesor va acompañado de un aumento en la densidad de poros, por lo que la duración de la incubación no varía (Massaro y Davis 2004).

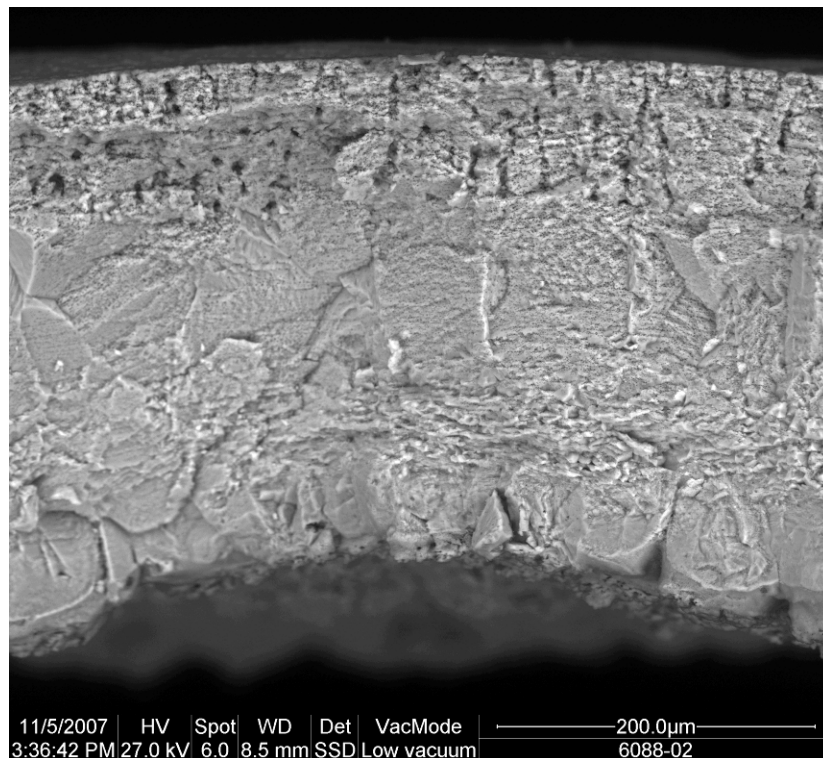


Imagen 3.47: Ultraestructura del polo estrecho de un huevo de Águila perdicera procedente de La Rioja colectado en 2007. El espesor y la ultraestructura son muy similares al ecuador del huevo.

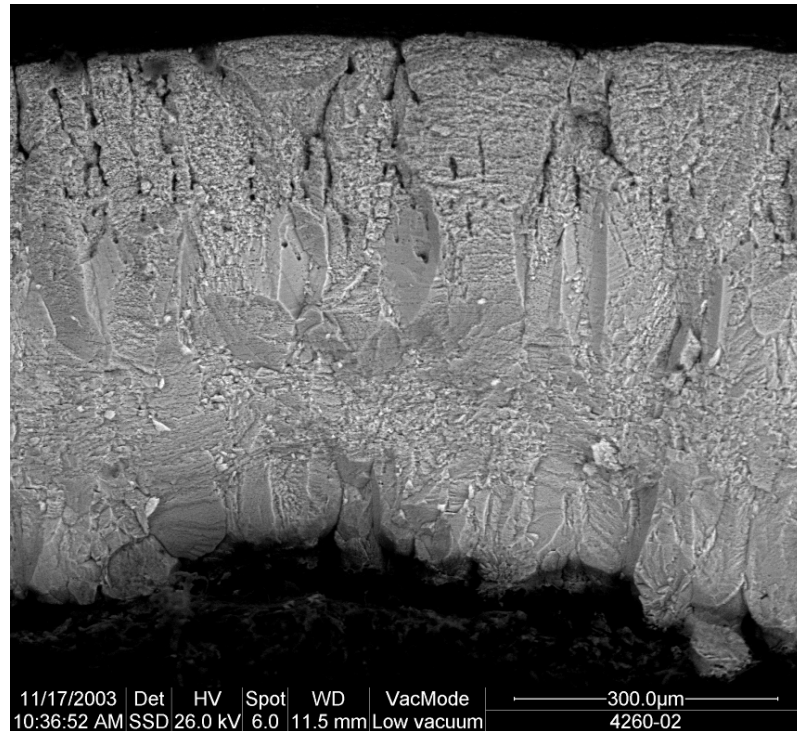


Imagen 3.48: Ultraestructura del polo grueso de un huevo de Buitre negro procedente de Madrid colectado en 2002. El espesor es menor que en el ecuador y la ultraestructura presenta notables diferencias respecto al ecuador.

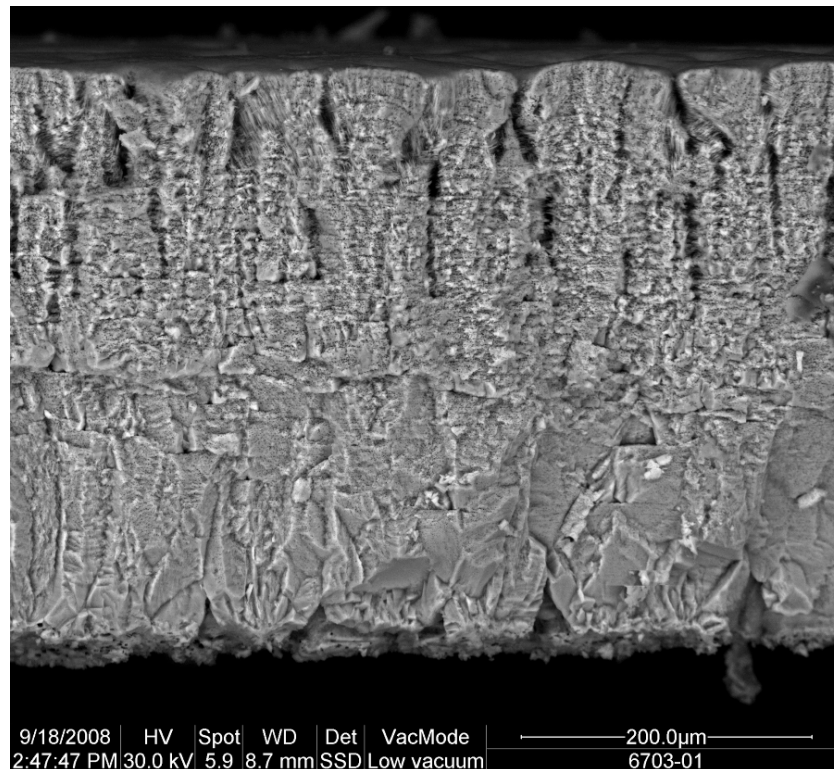


Imagen 3.49: Ultraestructura del polo grueso de un huevo de Cigüeña negra de Ávila colectado en 2001, en el que se observan las agrupaciones externas de la capa reticular formando los mamelones externos.

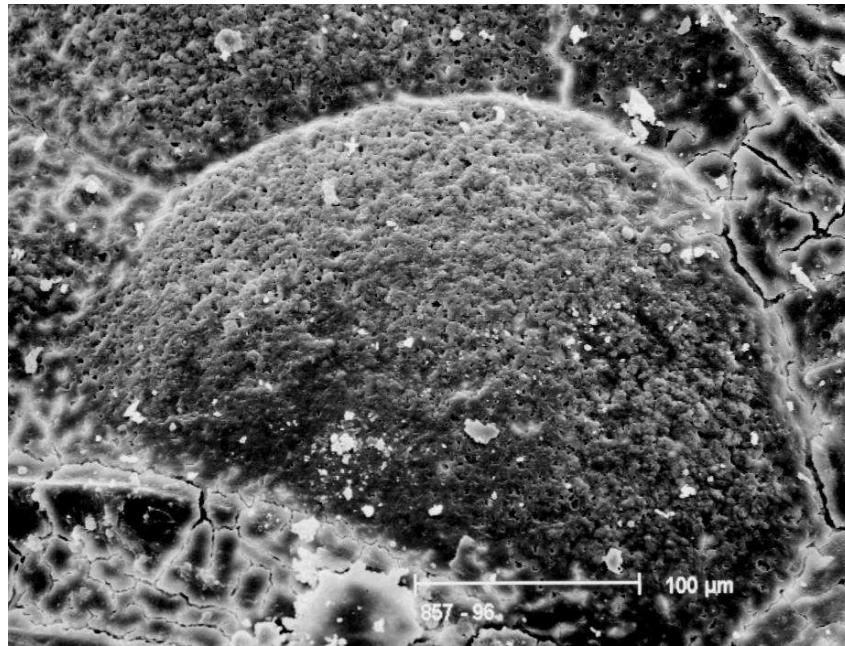


Imagen 3.50: *Detalle de un mamelón que sobresale en la superficie externa del polo ancho de un huevo de Quebrantahuesos.*

3.3. Efectos de los pesticidas en las aves silvestres

Teóricamente todos los pesticidas y contaminantes orgánicos son considerados como tóxicos no específicos. Los organoclorados, de mayor persistencia en el medio, afectan a varios sistemas enzimáticos en aves y mamíferos. Algunos de estos efectos se producen solo a dosis altas, pero la mayoría de los pesticidas a los niveles de contaminación ambiental muestran efectos secundarios. Existen cuatro tipos básicos de pesticidas: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Únicamente los piretroides son relativamente no tóxicos en vertebrados. Los organofosforados y carbamatos, mas modernos, con un efecto de choque y baja persistencia ambiental, producen únicamente efectos directos. Los organoclorados, por su elevada persistencia en el medio, van acumulándose en concentraciones crecientes y logarítmicas en la cadena trófica (fenómeno de biomagnificación), en cuyo final se encuentran las aves de presa.

Los pesticidas pueden afectar a las especies silvestres de varias formas: (1) causando mortalidad directa o alteraciones en el comportamiento (Mineau et al., 1999); (2) causando disminución en la productividad y alterando la reproducción (Ratcliffe, 1967 y 1970); (3) ejerciendo efectos subletales, como la disrupción hormonal o la inmunosupresión (Franson, 1996; Pain et al., 2007); (4) alterando el hábitat o (5) alterando o disminuyendo la disponibilidad de alimento (Newton 1974 y 1988). Existen considerables diferencias entre especies en la sensibilidad a los diferentes compuestos químicos. Incluso especies muy relacionadas pueden mostrar respuestas diferentes. Estas diferencias en la toxicidad implica que la valoración de los efectos de los contaminantes en un área y especie determinada no sea aplicable a otra especie próxima (Hoffman et al., 1996). La persistencia de los pesticidas varía también en las diferentes partes de un mismo hábitat y por lo tanto, la exposición (Hernández et al., 2008). Esto añade mayor complicación al estudio de la incidencia de la polución en las poblaciones de aves ya que la persistencia y grado de exposición puede ser muy diferente en distintos puntos del mismo hábitat (Peakall, 1974).

El efecto subletal (indirecto, secundario) mas documentado de un pesticida organoclorado, en concreto del DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) a través de su principal metabolito, el DDE (Dicloro Difenil dicloroEtileno), es el producido en el espesor de la cáscara de los huevos de las aves y reptiles. Numerosos autores, en especial a partir de los trabajos de Ratcliffe (1967 y 1970), Newton (1973), Newton y Bogan (1974) y Peakall y Cade (1975), demostraron el efecto directo que produce la acumulación de residuos de pesticidas en la disminución de las poblaciones de aves de presa. Los compuestos del grupo del DDT provocan una disminución en el espesor de la cáscara (Newton y Bogan, 1978; Kiff et al., 1979; Peakall y Kiff, 1979; Risbrough y Peakall, 1988; González e Hiraldo, 1988; Nisbet, 1989; Peakall, 1996; Helander et al., 2002; Hernández et al., 2008), mientras que otros pesticidas no están involucrados en este fenómeno (Newton y Bogan, 1978; Peakall y Lincer, 1995; Peakall, 1996; Helander et al., 2002), a excepción del Dicofol (Wiemeyer et al., 1989; Clark et al., 1990; Clark, 1995). Hoy en día, los efectos del DDE sobre la reproducción de las aves es uno de los aspectos mas estudiados dentro de la toxicología ambiental y la conservación (Bowerman et al., 1995; Helander et al., 2002).

Los primeros autores que demostraron el efecto del DDE sobre la cáscara de los huevos de aves de presa fueron Ratcliffe (1967) y Porter y Wiemeyer (1969). Estos autores demostraron que los principales efectos de los pesticidas organoclorados sobre la reproducción en aves de presa eran aumentos de la desaparición de los huevos en las puestas, en la rotura de los huevos durante la incubación y sobre todo, reducción del espesor de la cáscara de los huevos. Newton (1974) pudo demostrar pocos años después que la productividad del Gavilán (*Accipiter nisus*) en el Reino Unido era muy alta hasta 1947 (año en que empezó a ser utilizado el DDT de forma masiva en ese país) y que hasta entonces las tasas de mortalidad embrionaria eran muy bajas. Además, comprobó que no había registros de huevos rotos durante la incubación hasta ese año.

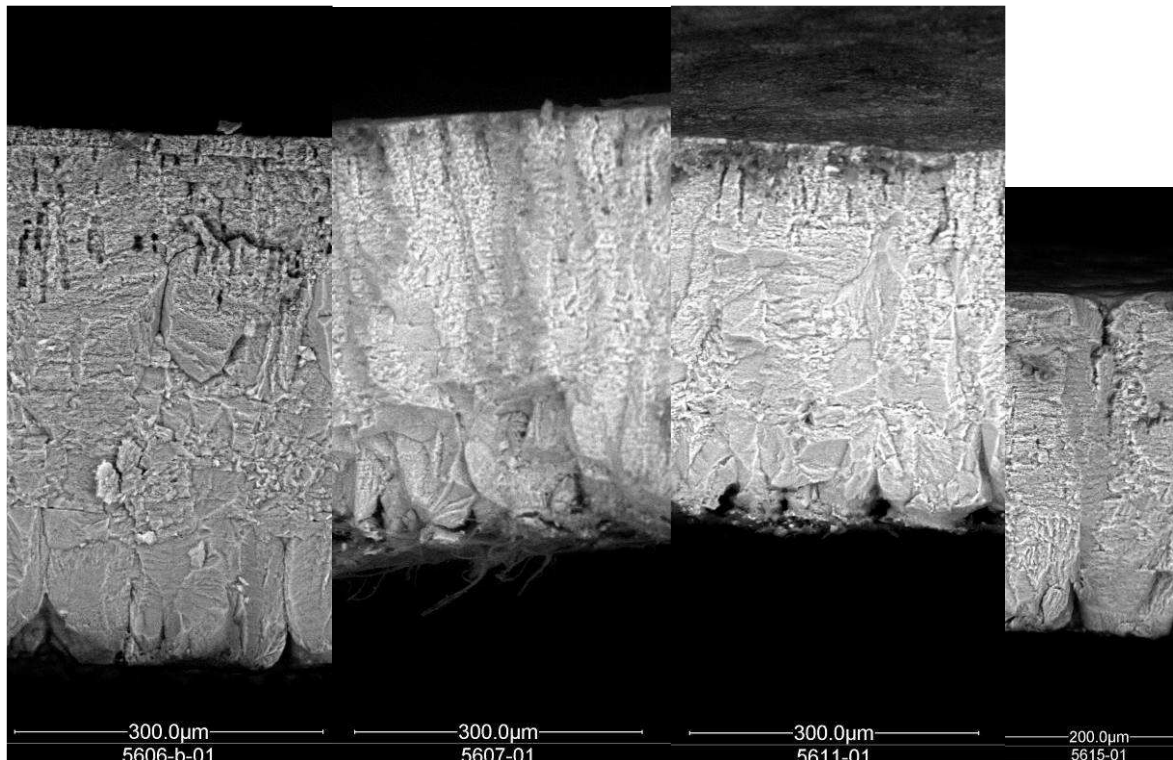


Imagen 3.51: Evolución del espesor de la cáscara de los huevos de Águila imperial en el Parque Nacional de Doñana. De izquierda a derecha: huevo con 520 μ de espesor y colectado en 1955, antes del uso del DDT en las marismas; huevo colectado en 1960, en los primeros años de uso del DDT, con una reducción del 13,5 % del espesor; huevo de 1988 con un 21,7 % de reducción y huevo de 1991 con una reducción del 31,6 %.

A partir de 1947 la productividad del Gavilán empezó a descender de forma drástica en áreas agrícolas, mientras que en áreas alejadas de los cultivos agrícolas, la productividad permanecía inalterable. Por otro lado, desde 1955 (año en que empezaron a utilizarse ciclodiénicos en agricultura), empezó a comprobar además que aumentaba también el número de huevos abortados (mortalidad embrionaria) y de huevos infértiles. Los análisis toxicológicos demostraron que estos cambios eran debidos a la presencia de DDT y sus metabolitos además de compuestos ciclodiénicos (aldrín y dieldrín) en el contenido de los huevos. Posteriormente, Newton (1988) pudo demostrar también que los pesticidas actuaban sobre las poblaciones incrementando la mortalidad y reduciendo la productividad y que el declive de las principales poblaciones de algunas aves de presa era debido a que este exceso en la mortalidad unido a un descenso en la productividad, había sobrepasado el nivel crítico a partir del cual la población empieza a extinguirse localmente.

Newton (1988) pudo así calcular el “nivel umbral” del DDT estudiando la reducción del espesor de la cáscara. Así, esta reducción ocurre con amplias variaciones de la concentración de DDE y la respuesta es lineal en una escala logarítmica. Sin embargo, la consecuencia de la reducción (rotura del huevo o mortalidad embrionaria por alteración de la respiración embrionaria) sólo se produce a partir de un porcentaje de reducción. De esta forma, por debajo de este umbral, ningún huevo falla y por encima, todos son inviables. El que el nivel encontrado en las diferentes poblaciones conduzca al declive poblacional, depende de cuantos huevos lleguen a ser fallidos y, en definitiva, del grado de contaminación de la población entera. Este autor definió el LPD (“Nivel de Declive Poblacional”) en las poblaciones de Halcón peregrino (*Falco peregrinus*) y Cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) en el Reino Unido, como la media geométrica de la transformación logarítmica de los niveles de un contaminante en un tejido determinado. Así, por ejemplo, determinó que el LPD del DDE para el Halcón peregrino en huevos en la población británica era de 3 ppm en peso fresco y para los HEOD (ciclodiénicos) de 0.7 ppm.

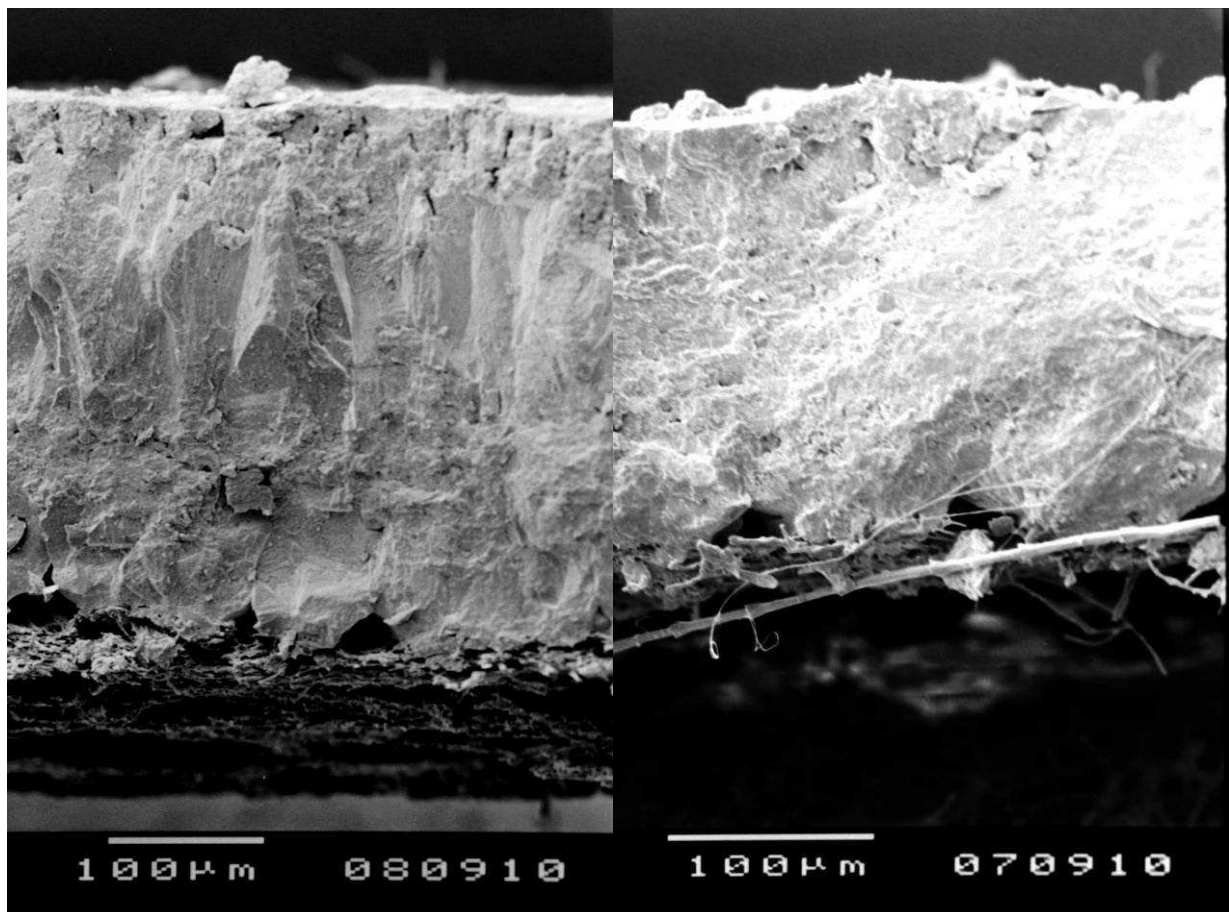


Imagen 3.52: Imagen de la cáscara de un huevo no contaminado de Águila perdicera (izquierda) y otro con una reducción del espesor de la cáscara del 34%. Ambos fueron colectados en la provincia de Valencia en 1998. Además de la reducción del espesor hay alteración de la morfología de los conos basales y de la cristalización de la capa palizada.

Además, este nivel crítico o LPD, depende en gran medida de la población estudiada, ya que es una indicación del incremento de la mortalidad y de la disminución de la fertilidad de una especie concreta en un área concreta. Es decir, que el LPD está influenciado por la tasa mortalidad por otras causas de la población estudiada. Cuanto

mayor sea la mortalidad por otras causas, menor es el LPD para un determinado pesticida en esa población. Una última limitación que el cálculo del LPD tiene, es que la exposición a un único pesticida es rara, ya que se suelen encontrar varios compuestos de forma simultánea en la misma muestra. De esta forma, suele haber efectos sinérgicos o aditivos en los efectos de cada pesticida en particular. En la actualidad, las aves de presa están expuestas a multitud (probablemente cientos) de compuestos a los que su organismo es completamente ajeno, y en particular a pesticidas que no presentan fenómenos de acumulación por su baja persistencia o su carácter hidrofílico, y que por lo tanto sus residuos no son detectados en tejidos. Por ello, la validez del cálculo del LPD para un contaminante determinado, dependerá de cuán predominante es el efecto de este compuesto sobre el resto.

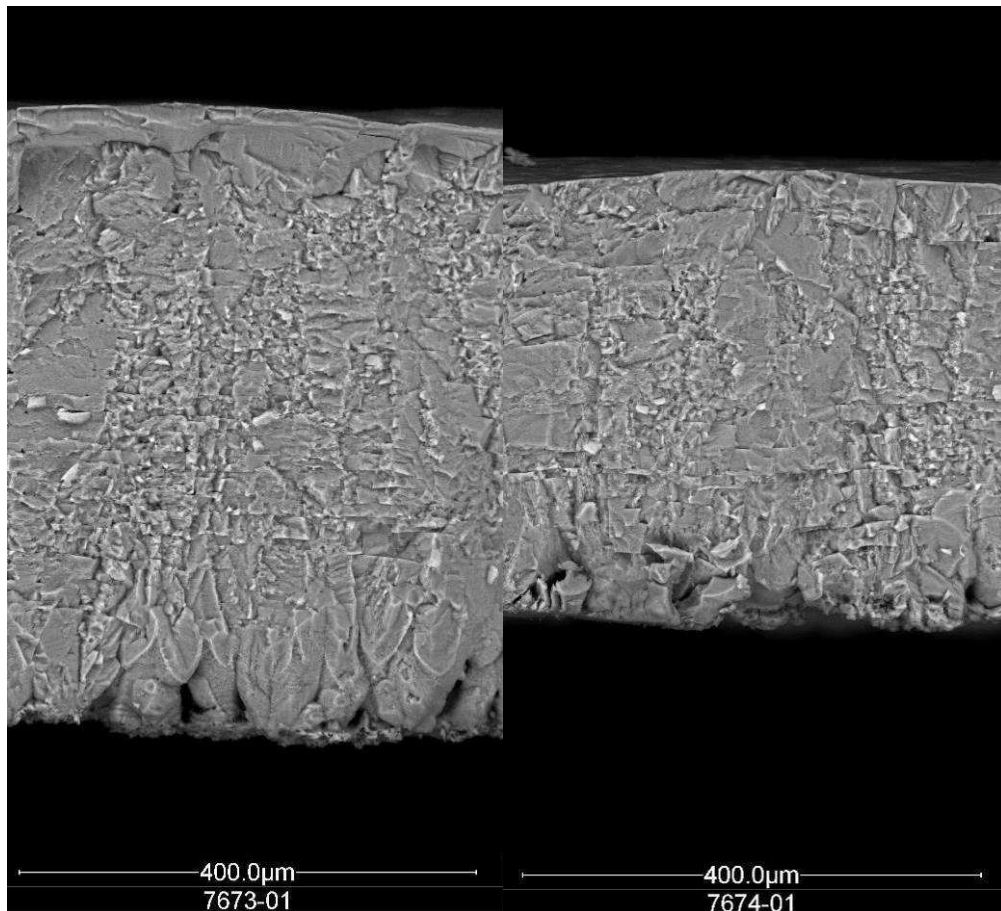


Imagen 3.53: Imagen de la cáscara de un huevo no contaminado de Avutarda (izquierda) y de otro con una reducción del espesor de la cáscara del 27% (derecha) y altos niveles de DDE (4.86 ppm). Ambos proceden de Navarra y fueron colectados muy recientemente, en 2010.

La reducción del índice de espesor de la cáscara, el llamado “Índice de Ratcliffe” (RI), definido por Ratcliffe en 1970, es un parámetro más sensible que la medición del espesor de la cáscara a la hora de detectar los efectos del DDE en la fertilidad de las aves de presa (Helander et al., 2002; Hernández et al., 2008). La reducción del RI es uno de los primeros síntomas de los efectos de la contaminación con DDE y es más importante que la reducción en el espesor, ya que no está influenciado por las variaciones geográficas en el tamaño del huevo y, por tanto, en el espesor de la cáscara, variaciones que se han detectado dentro de una misma población (Hernández et al., 2008).

De hecho, se ha demostrado que la reducción del espesor de la cáscara es un efecto colateral de la contaminación con DDE, antes que un mecanismo responsable del fallo reproductor (Nisbet, 1989; Helander et al., 2002; Hernández et al., 2008). En varias aves de presa se han encontrado descensos significativos de la productividad relacionados con contaminación por DDE sin que hubiera descensos significativos del espesor de la cáscara (Nisbet, 1989) aunque sí alteraciones en la cristalización y la ultraestructura (Longcore et al., 1971; Kiff et al., 1979; González e Hiraldo, 1988). Por otro lado, otros contaminantes organoclorados pueden influir en los parámetros reproductores sin producir cambios en la cáscara (Kiff et al., 1979, Wiemeyer et al., 1989; Peakall y Lincer, 1995) e incluso actuar de forma sinérgica con el DDE (McLane y Hughes, 1980; Risebrough y Peakall 1988; Elliott et al., 1996).

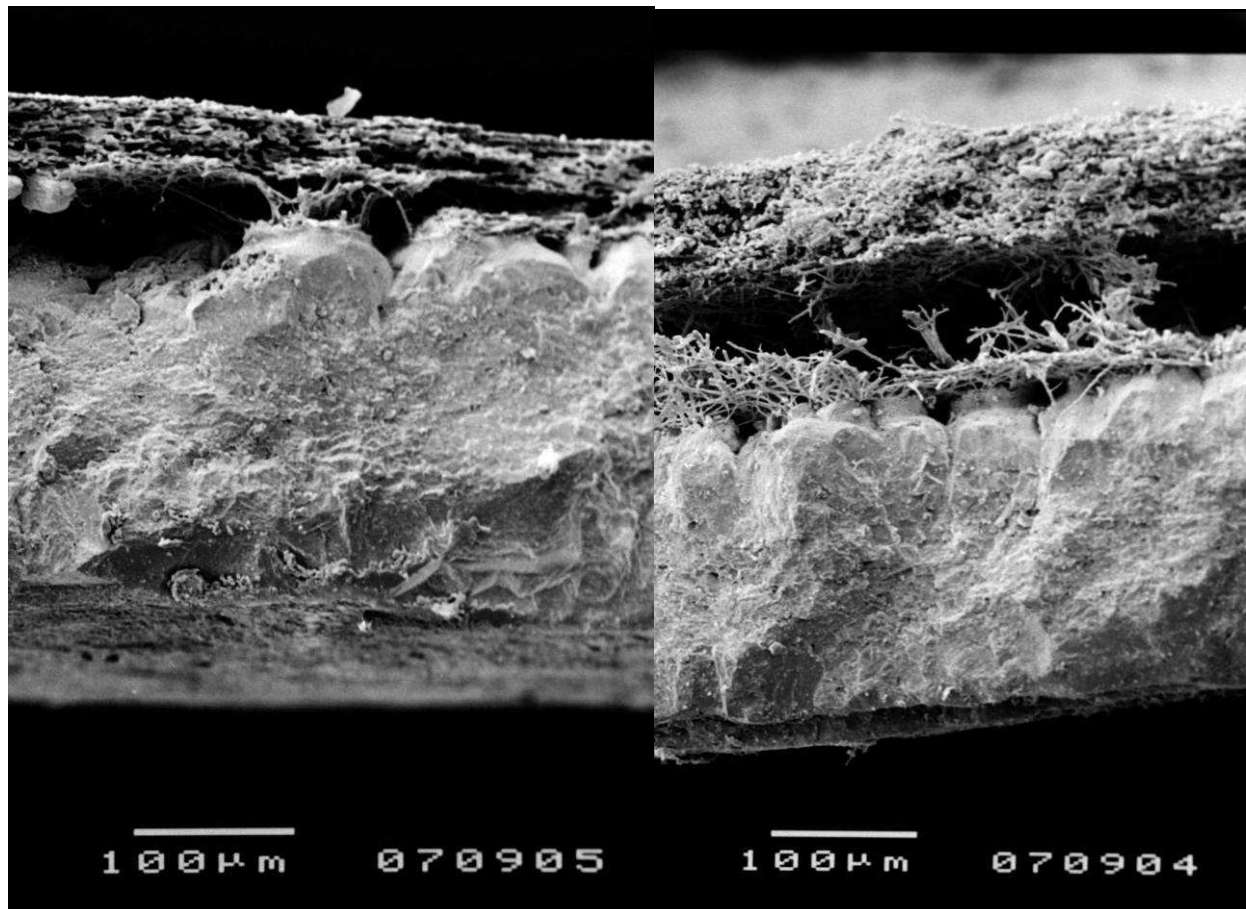


Imagen 3.54: Imagen de la cáscara de sendos huevos de Halcón peregrino contaminados con DDE y con reducciones del 27 (derecha) y 34 % (izquierda) en el espesor y ensanchamiento de los conos basales, reducción de la capa palizada y alteraciones en la cristalización de la cáscara.

Se ha establecido una relación inversa entre el nivel de DDE y el espesor de la cáscara (Bunk et al., 1985). Así, un nivel de 5 ppm de DDE es responsable de una reducción del 10 % en el espesor (Wiemeyer et al., 1972 y 1984; Nisbert, 1989) en el Águila calva (*Haliaeetus leucocephalus*). Este mismo nivel produce una disminución en el espesor del 20 % en el Cóndor de California (*Gymnogyps californianus*) (Kiff et al., 1979; Burnett et al., 2013), poniendo de manifiesto las diferencias en susceptibilidad al DDE de las distintas especies (Noble et al., 1993).

Además, el volumen del huevo y su tamaño guardan también relación con la contaminación con DDE y diversos estudios han demostrado una relación entre los niveles de DDE y el tamaño de la puesta, la fertilidad, el porcentaje de nacimientos y la productividad (Ratcliffe 1970; Elliott y Norstrom, 1998; Helander et al., 2002; Hernández et al., 2008). Así se ha establecido el LOAEL (*lowest-observable-adverse-effect-level*) para varias especies de aves de presa (Helander et al., 2002; Hernández et al., 2008). Se ha establecido un nivel crítico de DDE (LOAEL) para la fertilidad en la mayoría de las aves de presa de alrededor de 3.5 ppm (Wiemeyer et al., 1984; Noble et al., 1993; Hernández et al., 2008; Burnett et al., 2013). En el Águila imperial, este nivel crítico se ha establecido en 3.5 ppm (Hernández et al., 2008).



Imagen 3.55: Puesta de Águila perdicera retirada del nido en los Arribes del Duero (Zamora) en 2005 para determinar las causas del fracaso. La cáscara del huevo de la izquierda presentaba una reducción del espesor del 17 % y un nivel de DDE de 5.14 ppm y se rompió durante la manipulación. A la derecha, con un nivel de DDE de 3.30 ppm y reducción del espesor del 10%.

El efecto sobre el espesor de la cáscara se debe a la inhibición de la anhidrasa carbónica, la Ca-ATPasa y la Mg-ATPasa durante la deposición de calcio a nivel del oviducto (Peakall, 1979; Bird et al., 1983). Ejerce también efectos al inducir el sistema enzimático microsomal a nivel hepático (Miller et al., 1978) que acelera la degradación de las hormonas. Así, Peakall (1970) demostró que el DDT administrado a aves en periodo reproductor reducía de forma significativa los niveles séricos de estradiol, aumentaba la actividad del sistema microsomal hepático, reducía la deposición de calcio en la médula ósea de la tibia (formación de hueso medular) y reducía de forma significativa la actividad de la anhidrasa carbónica en las células del oviducto. Por su parte, Hyder y Cutkomp (1982), demostraron también que el DDE y el DDT reducían el aporte de ATP a las células del oviducto a través de la inhibición de Mg-ATPasa y de la Ca-ATPasa.

Respecto al carácter de disruptores hormonales del DDT y el DDE, se ha demostrado que el DDE actúa sobre el receptor androgénico, por lo que debe considerarse como antiandrogénico, mientras que el isómero *o,p'* del DDT (que está presente en las formulaciones comerciales como impureza) es el que mayor acción estrogénica ha mostrado (Mestres, 1999). Los efectos antiestrogénicos de estos compuestos se deben principalmente a la inducción del sistema microsomal hepático (Peakall, 1979). Por último, estos efectos de disrupción hormonal, tanto los compuestos del grupo del DDT como de los ciclodienicos (Porter y Weimeyer, 1969), se han demostrado experimentalmente en varias especies de aves (Fox y Donald, 1980). Así, se ha comprobado una relación directa entre los niveles de estos compuestos en tejidos de ejemplares adultos de algunas poblaciones y cambios en el comportamiento defensivo durante la incubación, así como cambios significativos en la frecuencia del relevo de los adultos durante la incubación y aumento de la frecuencia de abandono de la puesta (Blus, 1984; Hickey y Anderson, 1968; Newton, 1988).

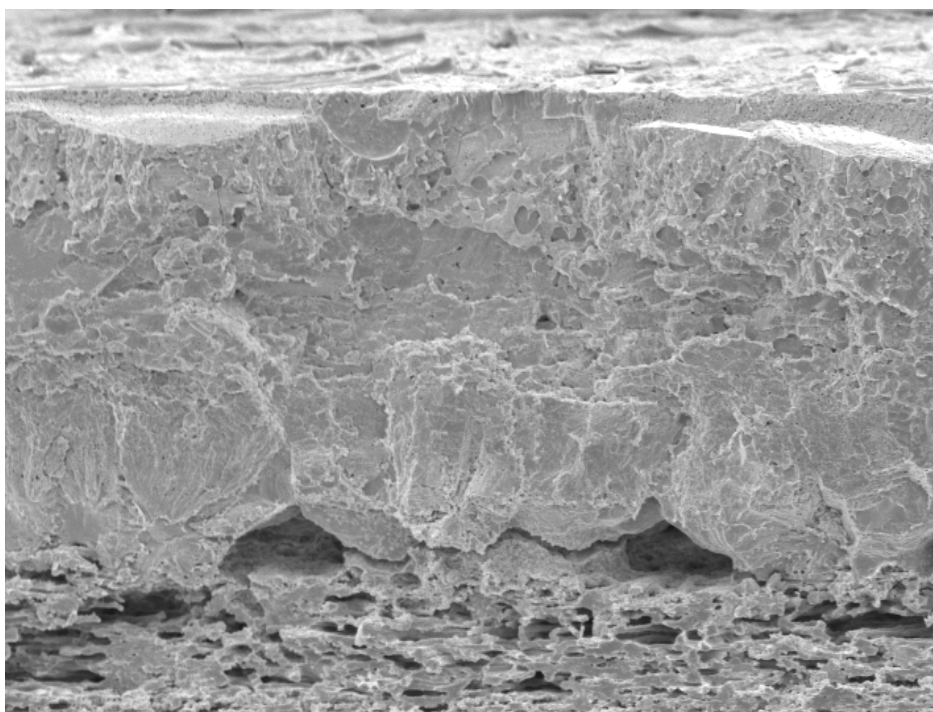


Imagen 3.56: Imagen ultraestructural de la cáscara de un cernícalo primilla de los Monegros (2003) donde la contaminación con DDE produjo engrosamiento de los conos basales y alteraciones en la cristalización de la capa palizada.

Los bifenilos policlorados (PCB's), que alcanzan el medio ambiente a través de los productos industriales y manufacturados, en especial plásticos, y derivados industriales como refrigerantes en condensadores o como fluidos hidráulicos o térmicos, pueden producir mortalidad embrionaria, así como alteraciones durante el crecimiento embrionario y postnatal, malformaciones así como alteraciones fisiológicas en las aves adultas (Elliott et al., 1996a). Los efectos de los PCB's sobre las poblaciones de animales silvestres son muy difíciles de cuantificar ya que se bioacumulan mezclas de isómeros con distinto grado de cloración con efectos subletales y ecotoxicológicos muy diferentes, incluido su efecto de disrupción hormonal sobre vertebrados (Wiemeyer et al., 1986; Elliott et al., 1996a). Así, los PCB's con posiciones orto libres, actúan como antiestrogénicos, mientras que los que poseen sustituciones en la posición orto, actúan como estrogénicos (Mestres, 1999).

Los parámetros mas utilizados para cuantificar de forma directa los efectos del DDE y otros derivados del DDT son el Índice de Ratcliffe (Ratcliffe, 1970) y los valores obtenidos con el sistema-beta-backscatter –BBS– (Forberg y Odsjo, 1983; Linden et al., 1984). El primero es un índice directo obtenido por medición y se utiliza para la determinación invasiva del espesor, mientras que el segundo, ya obsoleto, lo determinaba de forma indirecta e invasiva y era empleado en nido. Sin embargo, dado que el DDE a niveles bajos produce alteraciones ultraestructurales y de la cristalización en cáscaras sin reducción significativa del espesor (Longcore et al., 1971; Kiff et al., 1979; González e Hiraldo, 1988), el método mas objetivo de estudiar los efectos del DDE es mediante microscopía electrónica de barrido. Por ello, en los últimos años, el estudio de la ultraestructura y composición de la cáscara se ha perfilado como el “gold standard” para la cuantificación directa de los efectos de los pesticidas sobre la viabilidad de los huevos (Fox, 1976 y 1979, Grubb et al., 1990; Bland, 1992).

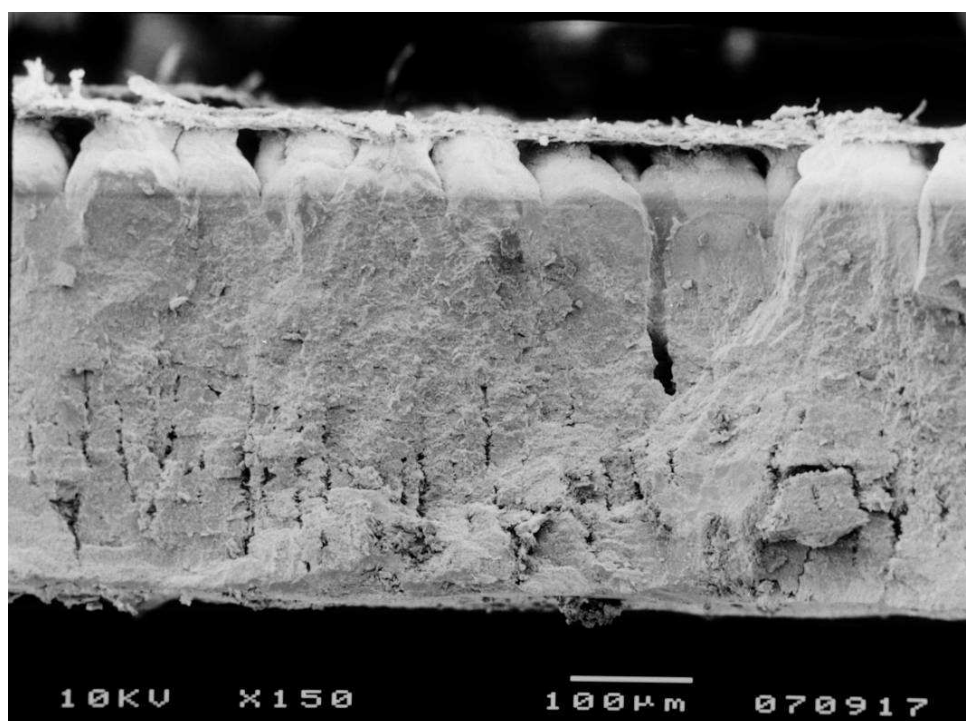


Imagen 3.57: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de Cigüeña negra da la provincia de Ávila colectado en 1998 con una reducción del 11 % del espesor de la cáscara, elongación de los conos basales, disminución de la capa palizada y pérdida de la estructura cristalina.

El grado de contaminación por pesticidas organoclorados ha disminuido en general en los últimos años tras las limitaciones y prohibiciones en el uso y comercialización dentro de la UE (Mañosa et al., 2003; Hernández et al., 2008). Sin embargo, aunque el uso del DDT y sus derivados en agricultura están prohibidos debido a su alta persistencia ambiental y sus efectos ecotoxicológicos y sobre la salud pública (Camps et al., 1989), los efectos de su empleo en el pasado estarán persistentes en las aves de presa todavía algunas décadas (Hernández et al., 2008). El uso de hexaclorociclohexanos, en concreto del lindano, ciclodiénicos, como aldrin o dieldrin, o los derivados del clordano (oxiclordano), bencenos clorados (tetraclorobenceno) y otros compuestos clorados como los Endosulfanes, se han estado utilizando hasta hace escasos años. Además, se comercializa sin ningún tipo de regulación especial el dicofol, insecticida organoclorado de

estructura muy similar al DDT. Se ha demostrado que este compuesto tiene el mismo efecto sobre el organismo y la reproducción que el DDT (Wiemeyer et al., 1989; Clark, 1990). Además, las formulaciones comerciales de dicofol contienen hasta un 15 % de DDT, DDE y cloro-DDT (conocidos como DDT residual) que constituyen una importante fuente de contaminación. Por otro lado, aunque los resultados experimentales son contradictorios, algunos autores han sugerido su conversión a DDE en el organismo aviar (Clark, 1990).

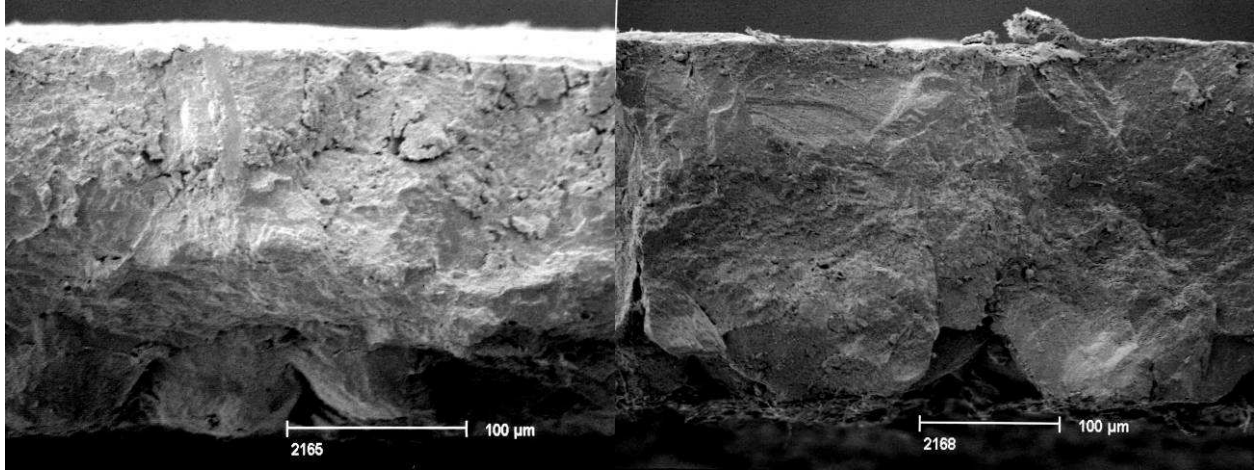


Imagen 3.58: *Imágenes ultraestructurales de la cáscara de sendos huevos de Halcón peregrino colectados en el Parque Natural del Duratón (Segovia) en 1988 (izquierda) y 1985 con una reducción del espesor del 18 y 16 %, respectivamente y niveles de DDE en torno a 2.8 ppm. Se observa la morfología anormal de los conos basales, con ensanchamiento y reducción de su número, reducción de la capa palizada y pérdida de la estructura cristalina de la cáscara.*

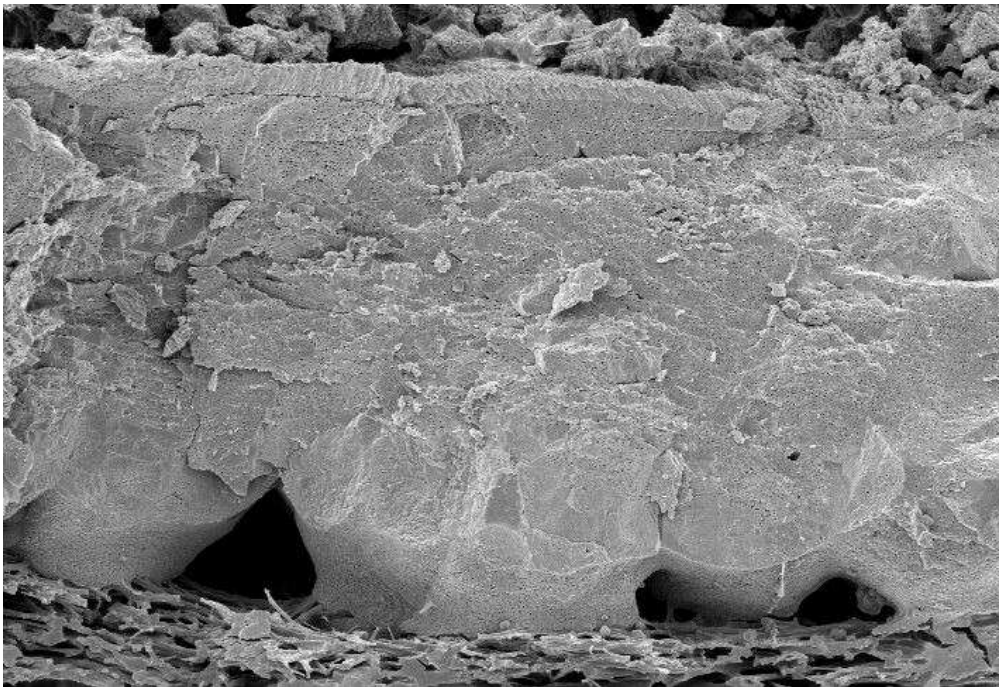


Imagen 3.59: *Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de Águila perdicera de La Rioja colectado en 2001 y con un engrosamiento extremo de los conos basales, una importante reducción de la capa palizada y del espesor (32 %) y pérdida de la estructura.*

Existen descripciones de la ultraestructura de los principales grupos de especies de aves mas vulnerables o de mayor riesgo de exposición a los xenobióticos (Tyler, 1966 y 1969; McFarland et al., 1971). Aunque no existan reducciones significativas en el espesor, puede haber alteraciones en la estructura y composición que comprometan la viabilidad del embrión (Cooke 1979). Los primeros estudios ultraestructurales de la cáscara de los huevos de aves silvestres se realizaron hace relativamente poco tiempo (escasamente 35 años) a raíz de ser detectados los efectos que producía a contaminación química en las aves silvestres. El primer estudio sobre la ultraestructura de la cáscara de las aves silvestres se remonta a 1971 (Simons, 1971). La primera descripción detallada de la ultraestructura y composición de la cáscara del huevo en aves silvestres es la de Becking (1975), cuya nomenclatura ha sido la mas adoptada en estudios posteriores. Igualmente Tyler (1966 y 1969), McFarland et a. (1971), Erben y Krampitz (1972), Peakall et al. (1973), Fox (1976), Kiff et a. (1979), Cooke (1979) y Hunt et al. (1992) proporcionan abundante información sobre la ultraestructura y composición y los cambios estructurales debidos a pesticidas en los huevos de las aves.

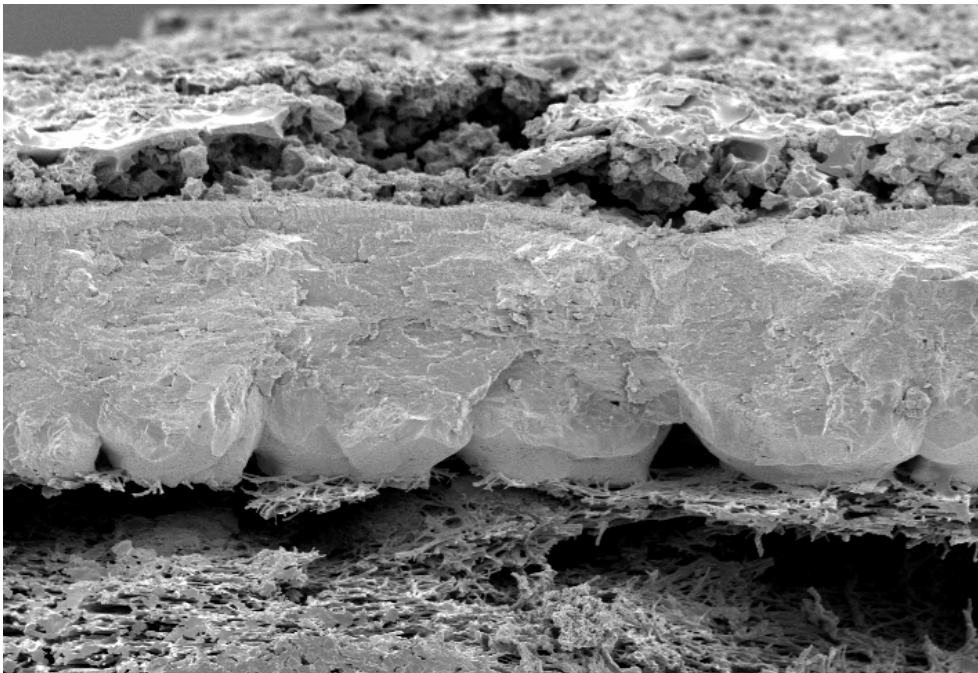


Imagen 3.60: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de *Águila perdicera* de La Rioja colectado en 2001 y con un engrosamiento de los conos basales, una importante reducción de la capa palizada, que prácticamente ha desaparecido, y del espesor (35 %).

Cooke (1979) encontró en huevos contaminados con DDE que la relación entre la altura de los conos basales en el corte transversal de la cáscara y el espesor de la capa mamilar se incrementaba significativamente respecto a los huevos del periodo pre-DDT. De esta forma definió un índice, conocido como Índice de Cooke que relaciona ambas medidas y que resulta extremadamente sensible en detectar cambios ultraestructurales debidos al DDE (Hernández et al., 2008).

La alteración de los conos basales, con una estructura anormal, en los huevos contaminados con DDE, se debe a un número menor de núcleos de osificación cuando se

sintetiza la porción calcificada de la cáscara, por lo que los conos basales que se forman están mas engrosados y con espacios mayores entre ellos, fusionándose para formar la capa palizada mas cerca de ésta (Greenburg et al., 1979). Erben y Krampitz (1971) encontraron que la porción orgánica de las cáscaras era mucho mayor en huevos contaminados (por eso se detectan cambios en la composición) y la composición en aminoácidos se encuentra alterada, afectando el DDE la síntesis proteica y la formación de núcleos de osificación y esta alteración tiene lugar en el istmo y no el oviducto como las alteraciones de la porción calcificada (Greenburg et al., 1979). Las alteraciones en el número y distribución de los conos basales afecta a la dureza de la cáscara (Simons, 1971; Parsons, 1982).

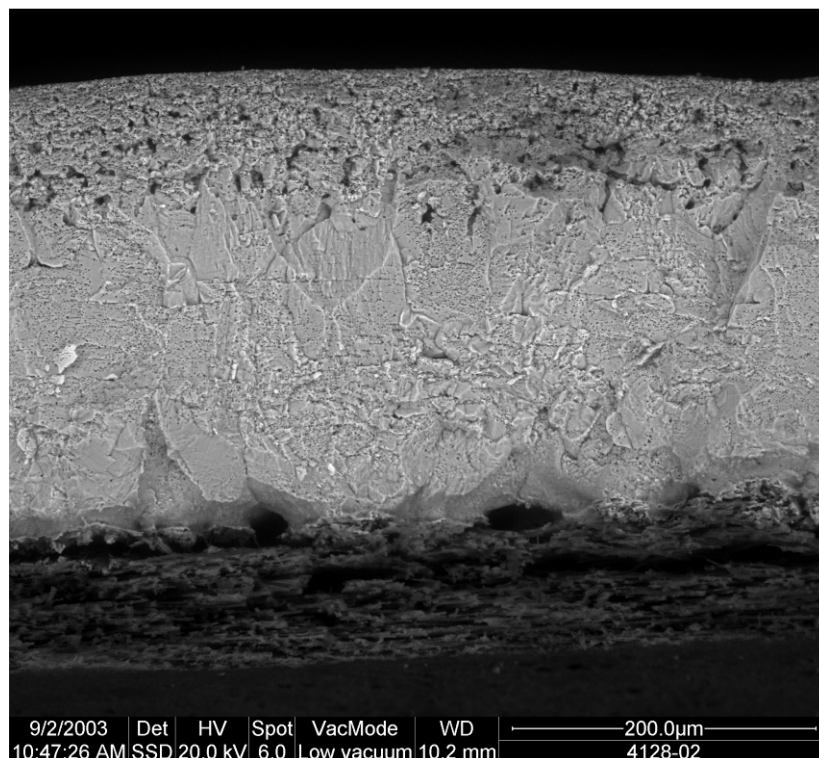


Imagen 3.61: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de Águila pescadora colectado en las Islas Chafarinas en 2003, con altos niveles de DDE y una reducción del espesor del 14 % y en la que únicamente se aprecian alteraciones en la orientación de los conos basales, cierto engrosamiento y reducción de su número con incremento del espacio entre ellos.

Esta alteración en la síntesis de proteínas es la responsable de formación de protuberancias entre las membranas testáceas y la porción calcificada de la cáscara en huevos contaminados (Bland, 1992). Se ha considerado que estas protuberancias son núcleos de cristalización "gigantes" pero que carecen del correspondiente cono basal. Otras alteraciones descritas son irregularidades y microfisuras en la cáscara que se corresponden con alteraciones localizadas en la estructura de la cáscara (Bland, 1992).

No todos los huevos contaminados presentan disminución en el número de conos basales; al contrario, la reducción en el número de conos basales o la morfología anormal no es exclusiva de la contaminación con DDE (Fox, 1976; Greenburg et al., 1979; Bland, 1992). El DDE no sólo puede afectar al número de núcleos de osificación. Haywood y Ohmart (1983) notaron la presencia de microporos minúsculos que incrementaban la pérdida de agua y disminuían la dureza de la cáscara. Fox (1976) encontró lo contrario,

que las pérdidas de agua eran menores por la disminución del número de poros en las cáscaras contaminadas. Cooke (1979) encontró también una reducción el área funcional total que disminuía la conductancia al vapor de agua. Simkiss (1986) explicaba las diferencias en la conductancia de las cáscaras contaminadas a la morfología de los poros antes que a los cambios en su número. En cualquier caso, durante la incubación artificial de huevos contaminados las pérdidas de agua son dos o tres veces mayores que en los huevos no contaminados (Bland, 1992) y mayores que las pérdidas descritas del 12-18 por Rahn et al. (1980).

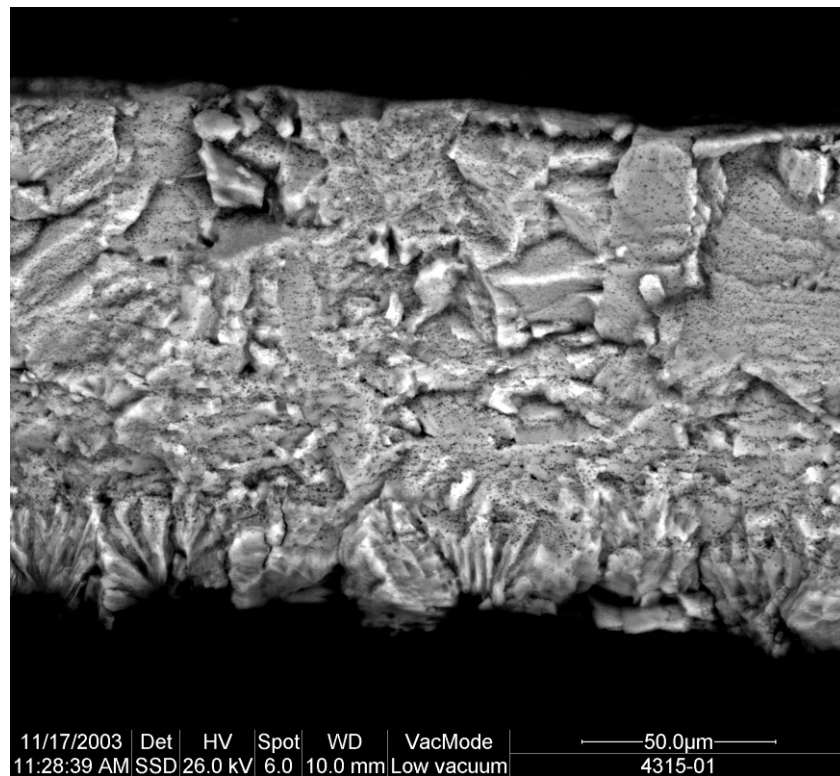


Imagen 3.62: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de Cernícalo primilla colectado en los Monearos (Huesca) en 2003, con altos niveles de DDE. Se observa una desorientación de los conos basales y una cristalización anómala.

Existen descripciones de varias variaciones en la morfología ultraestructural que se desconoce si están producidas por el DDE o son hallazgos accidentales (Bland, 1992). A raíz de generalizarse el estudio ultraestructural para cuantificar los efectos de los pesticidas sobre la cáscara, muchas de estas variaciones han podido ser descritas pero no siempre guardan relación con la contaminación. Así Bland (1992) describe en el Águila calva americana conos basales fragmentados o carentes de núcleo mamilar en huevos normales y Solomon (1997) describe la presencia, de forma fisiológica, de conos basales de menor tamaño y carentes también de núcleo mamilar y los denomina "conos B". Algunas concreciones no cristalinas que encuentra Bland (1992) podrían ser fisiológicas ya que Solomon (1997) describe concreciones en la superficie de la cáscara y embebidos en las capas mineralizadas en huevos de gallinas jóvenes. Lo mismo ocurre con las proyecciones globulares que aparecen en la superficie externa de la cáscara y que algunos autores han considerado que son debidas a disrupciones de la cutícula externa debido al efecto de contaminantes organoclorados. Sin embargo, Garret (1973) ya las describía como fisiológicas y sin relación con la contaminación, Solomon (1997) encuentra

formaciones similares en gallinas y se han encontrado en huevos no contaminados de Halcón peregrino, Cigüeña negra, Águila imperial e incluso Quebrantahuesos (datos inéditos).

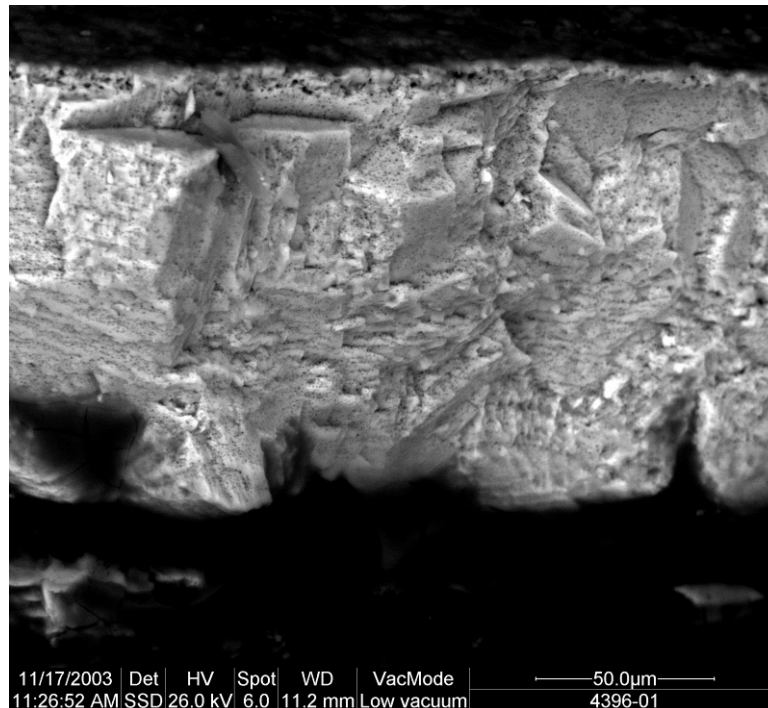


Imagen 3.63: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de Cernícalo primilla colectado en los Monearos (Huesca) en 2004, con altos niveles de DDE. Se observa una alteración de los conos basales y una cristalización anómala.

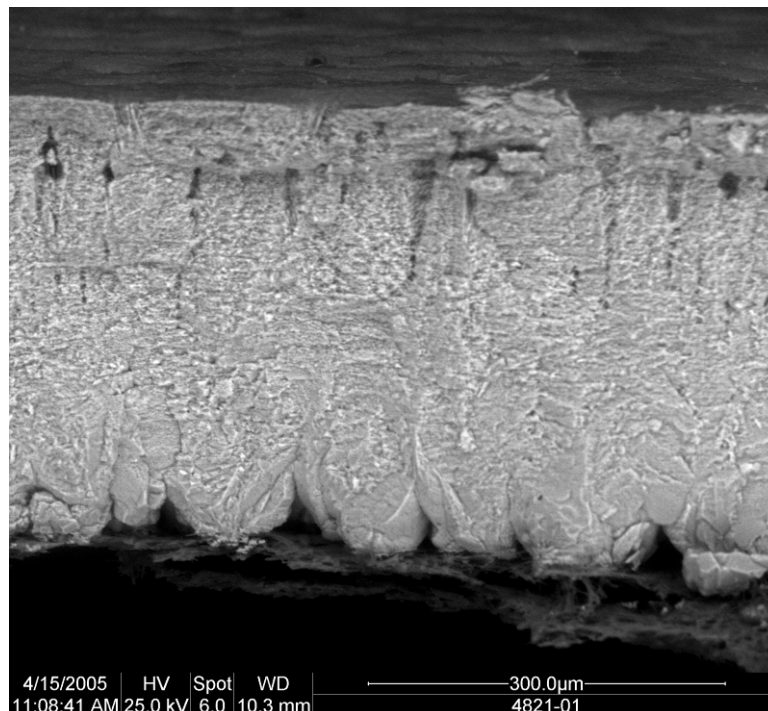


Imagen 3.64: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de Águila perdicera colectado en Badajoz en 2004 con un 21% de reducción del espesor.

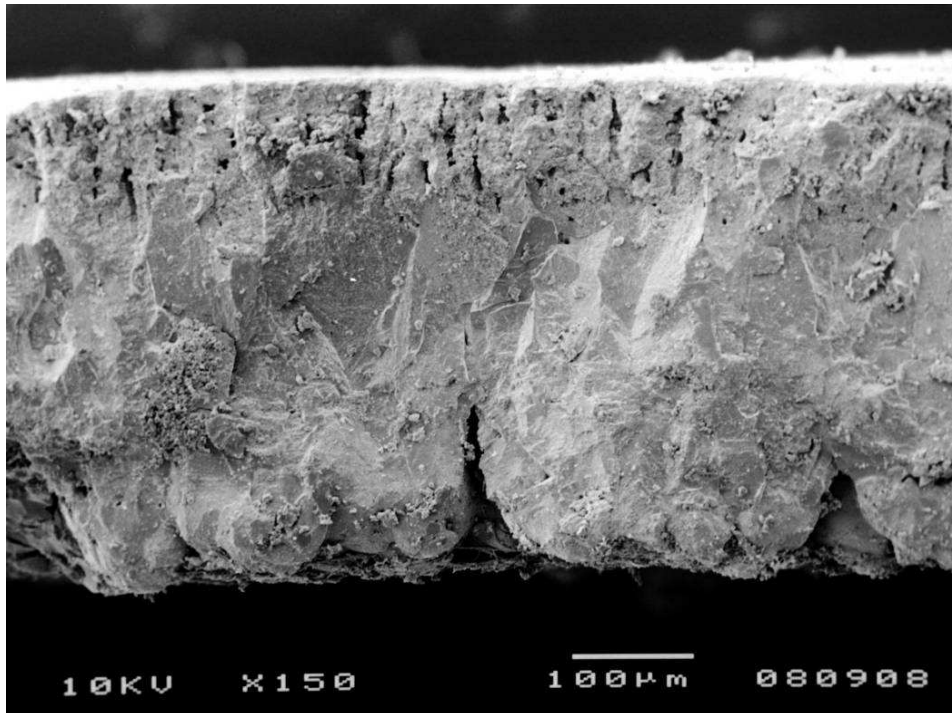


Imagen 3.65: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de Águila perdicera colectado en Cáceres en 1998 mostrando efectos por debajo del nivel crítico de DDE, como engrosamiento y pérdida de la estructura y orientación de los conos basales.

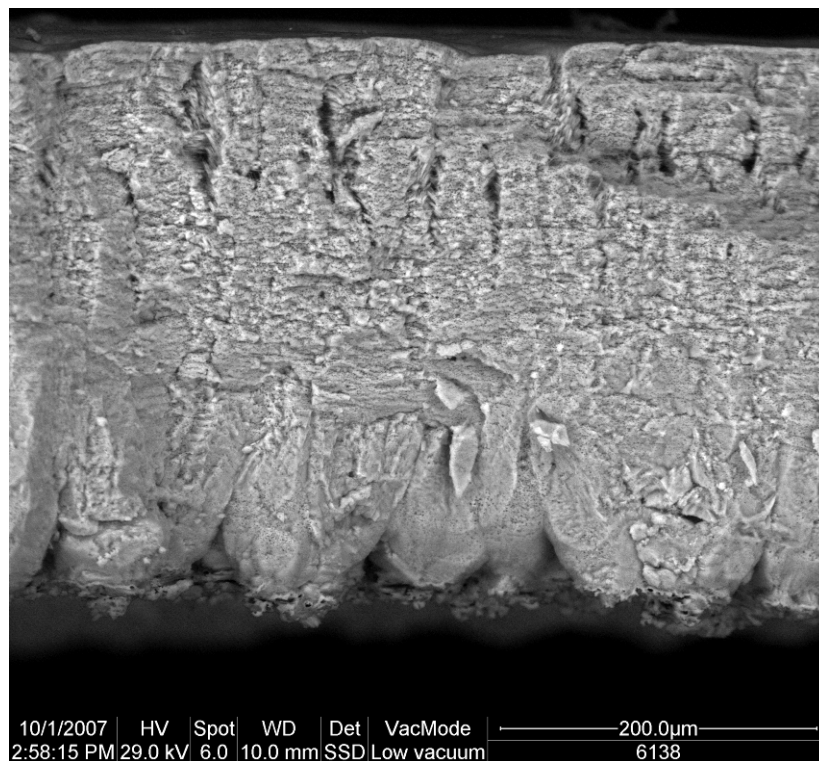


Imagen 3.66: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de Cigüeña negra colectado en Ávila en 2005 contaminado con DDE, con reducción de la capa palizada y un un 29% del espesor y cristalización alterada.

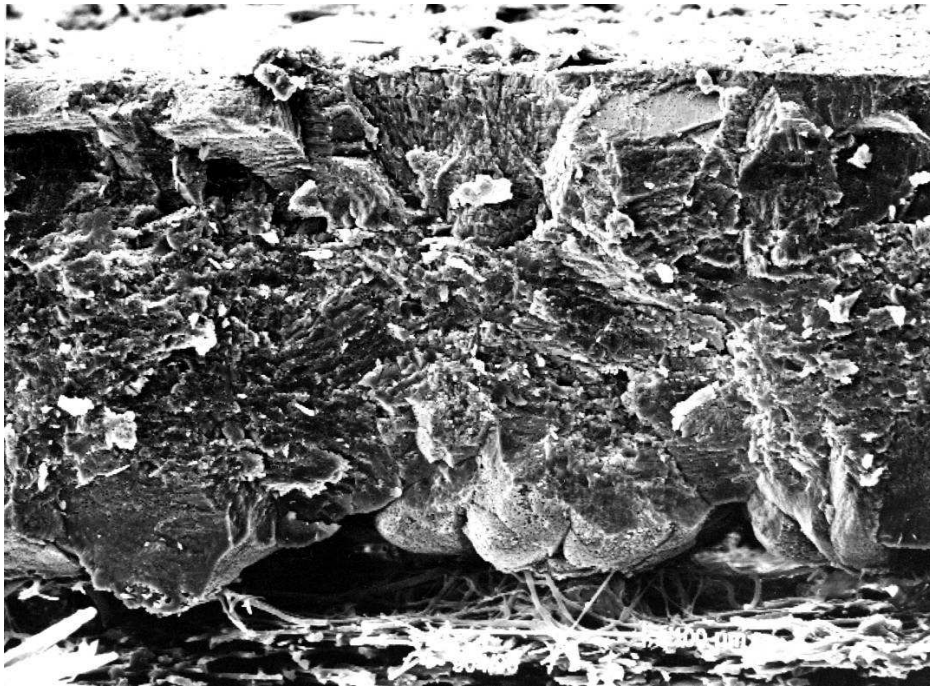


Imagen 3.67: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de Halcón peregrino colectado en Madrid en 1996, con altos niveles de DDE. Se observa una alteración de los conos basales y una cristalización anómala.

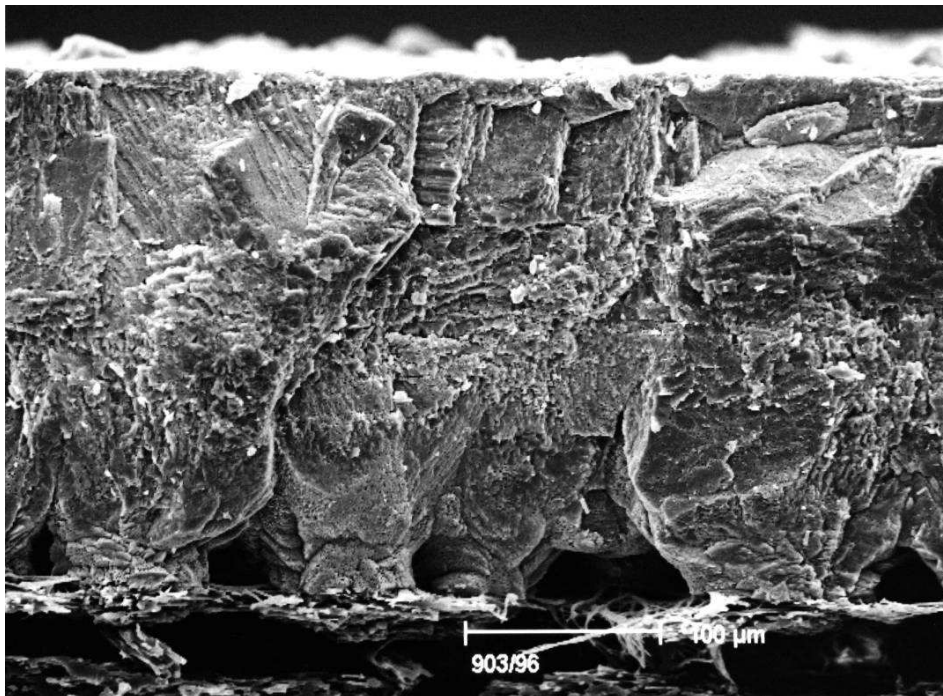


Imagen 3.68: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de Halcón peregrino colectado en Madrid en 1996, con altos niveles de DDE. Se observa una alteración de los conos basales y una cristalización anómala.

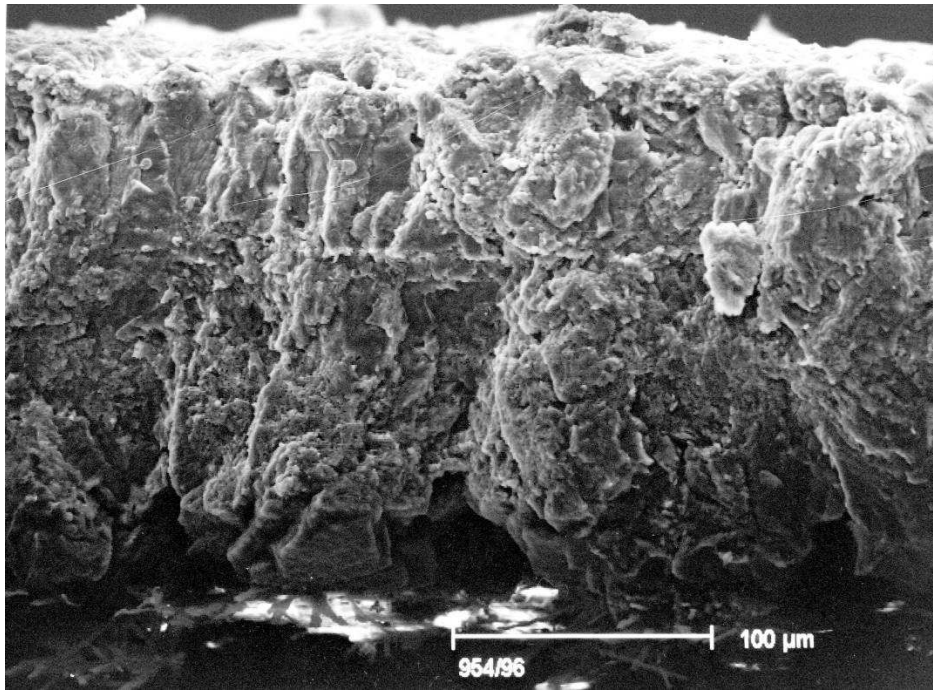


Imagen 3.69: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de Águila perdicera colectado en Cáceres en 1996 mostrando alteraciones en la cristalización por el DDE.

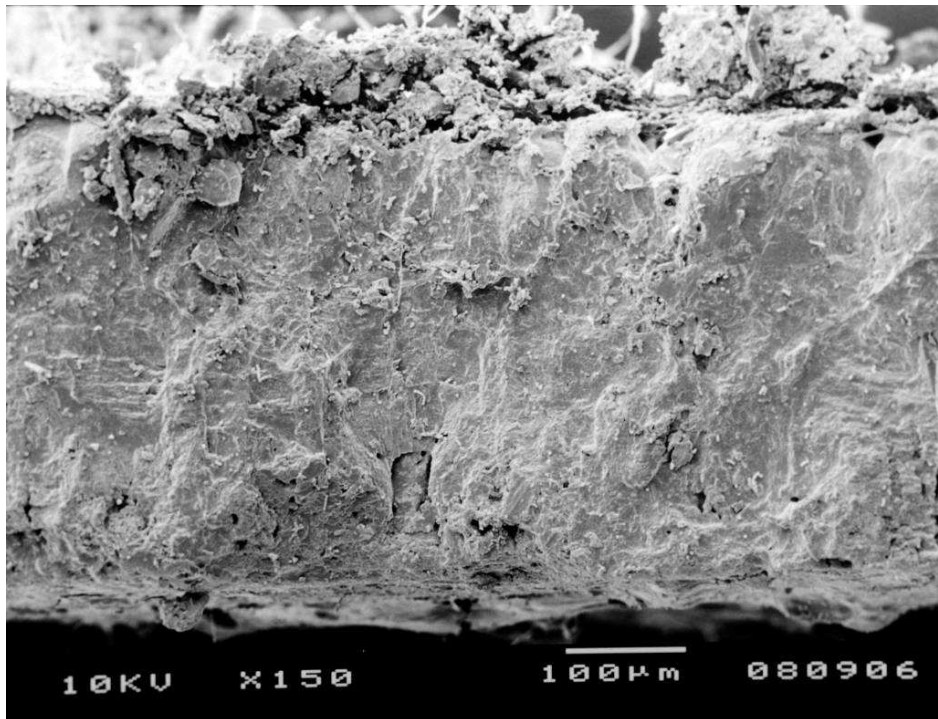


Imagen 3.69: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo infértil de Águila perdicera colectado en Valencia en 1997, con formación de protuberancias entre las membranas y la cáscara, así como incrustaciones no cristalinas en las capas mineralizadas.

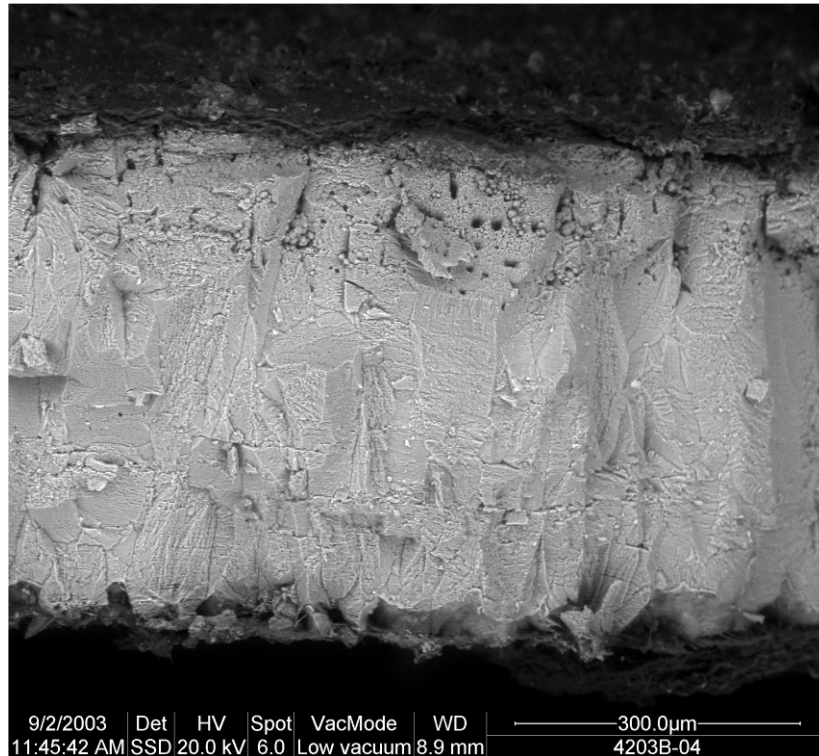


Imagen 3.70: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo de Quebrantahuesos colectado en Lleida en 2004 con concreciones globulares fisiológicas embebidas en la capa reticular.

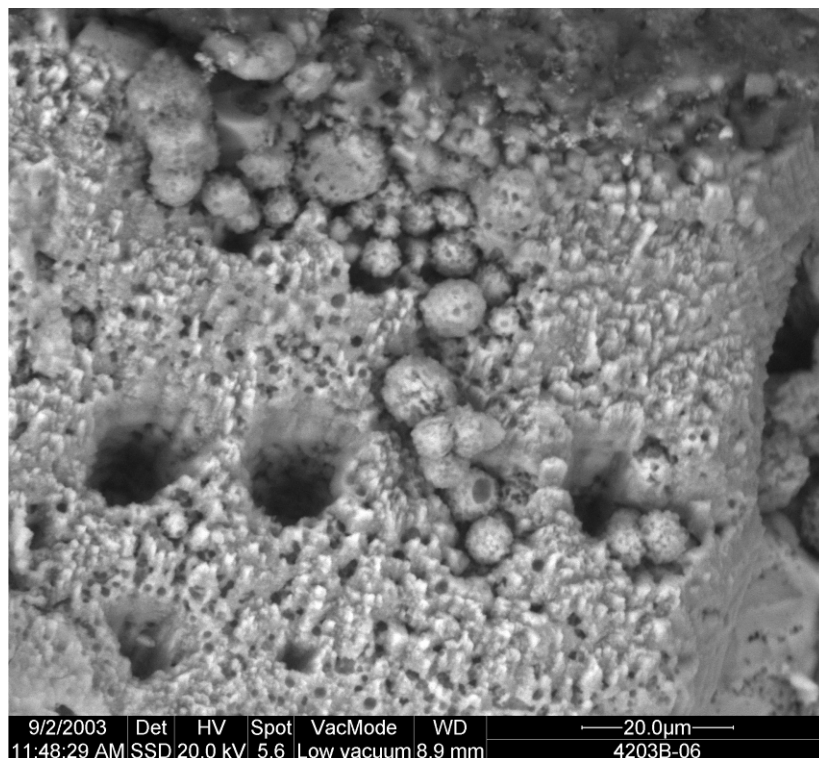


Imagen 3.71: Detalle de las concreciones globulares embebidas en la capa reticular de la cáscara de la Imagen 3.70.

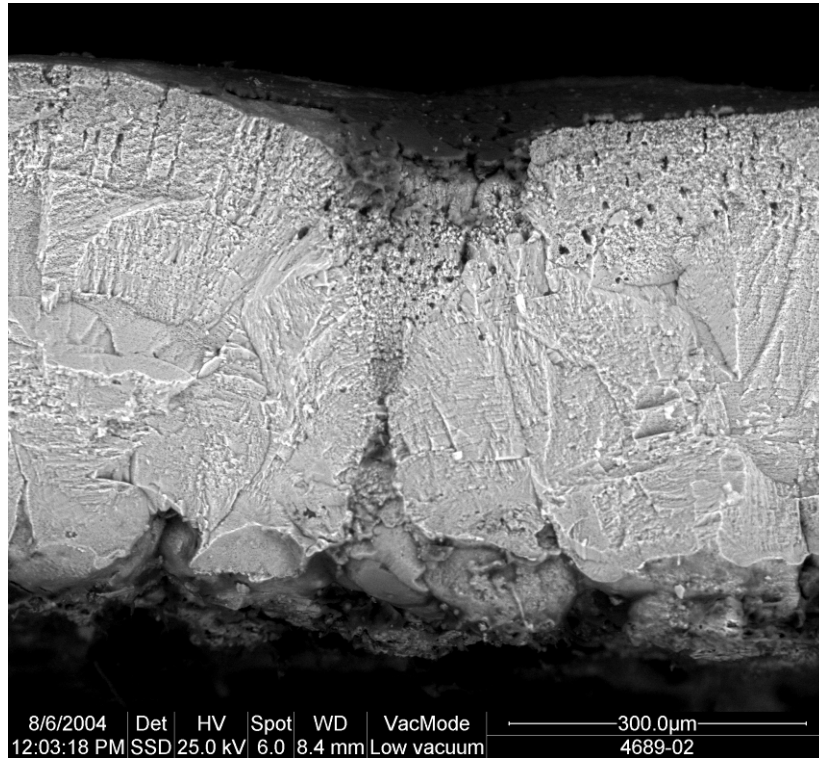


Imagen 3.72: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo de Quebrantahuesos colectado en Córcega en 2004. Se observa un gran poro delineado por una fisura circular y que carece de capa reticular y el resto de capas presentan una estructura desorganizada. Esta misma alteración ha sido descrita en huevos de Águilas calvas contaminados con DDE (Bland, 1992).

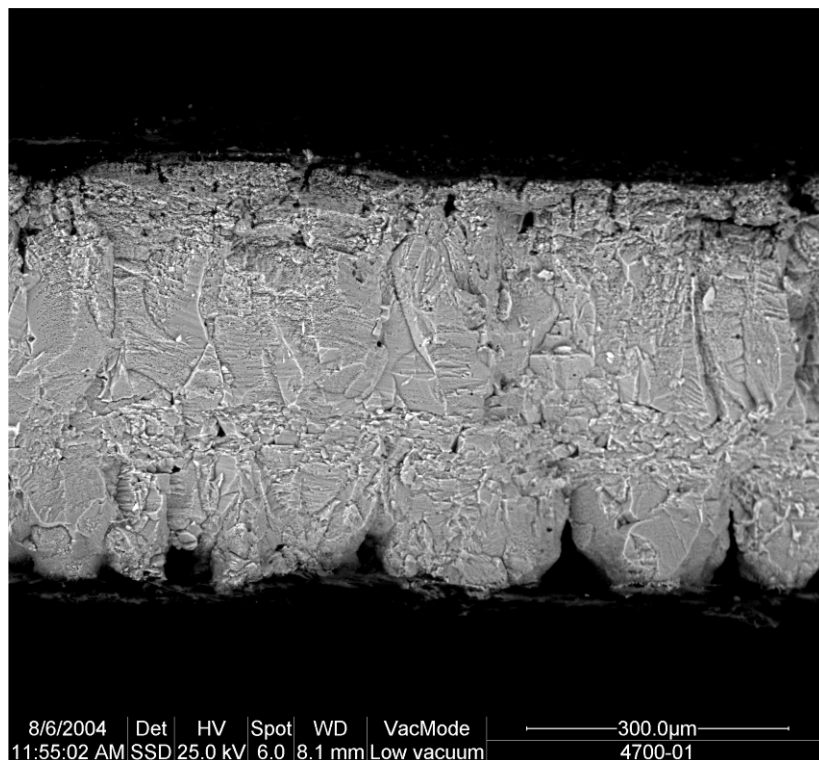


Imagen 3.73: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo de Quebrantahuesos colectado en Córcega en 2004. Se observa reducción del espesor y de la capa palizada y engrosamiento de los conos basales con morfología anómala, típicos de la contaminación por DDE.

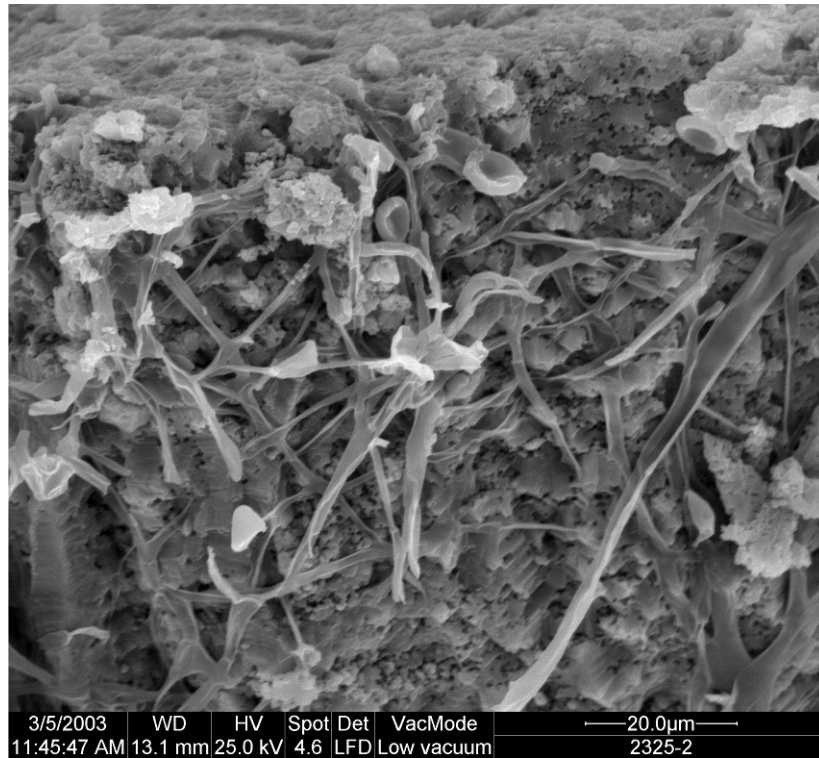


Imagen 3.74: Imagen ultraestructural de la cáscara de un huevo de Águila imperial colectado en el Parque Nacional de Doñana en 1992 en el que se aprecia la contaminación con hifas fúngicas que penetran toda la capa mamilar hasta la capa palizada. Las alteraciones en la ultraestructura facilitan la entrada de patógenos y microorganismos oportunistas al huevo.



Imagen 3.75: Protuberancias y concreciones en la superficie externa en el polo ancho de un huevo de Quebrantahuesos de Lleida colectado en 2006. Solomon (1997) consideraba que no influyen en la viabilidad del huevo y encuentra que son típicas de hembras jóvenes.

CAPITULO 4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Área y población de estudio

El Quebrantahuesos está presente en la práctica totalidad de los Pirineos, a excepción de la parte mas oriental (Heredia, 1991a). La población se expandió en los 90 hacia el oeste, asentándose en los llamados Montes Vascos, llegándose incluso a colonizar tres territorios y constatar una pareja reproductora en uno de ellos. Estos Montes constituían un área extrapirenaica que servía de corredor entre los Pirineos y la Cordillera Cantábrica.

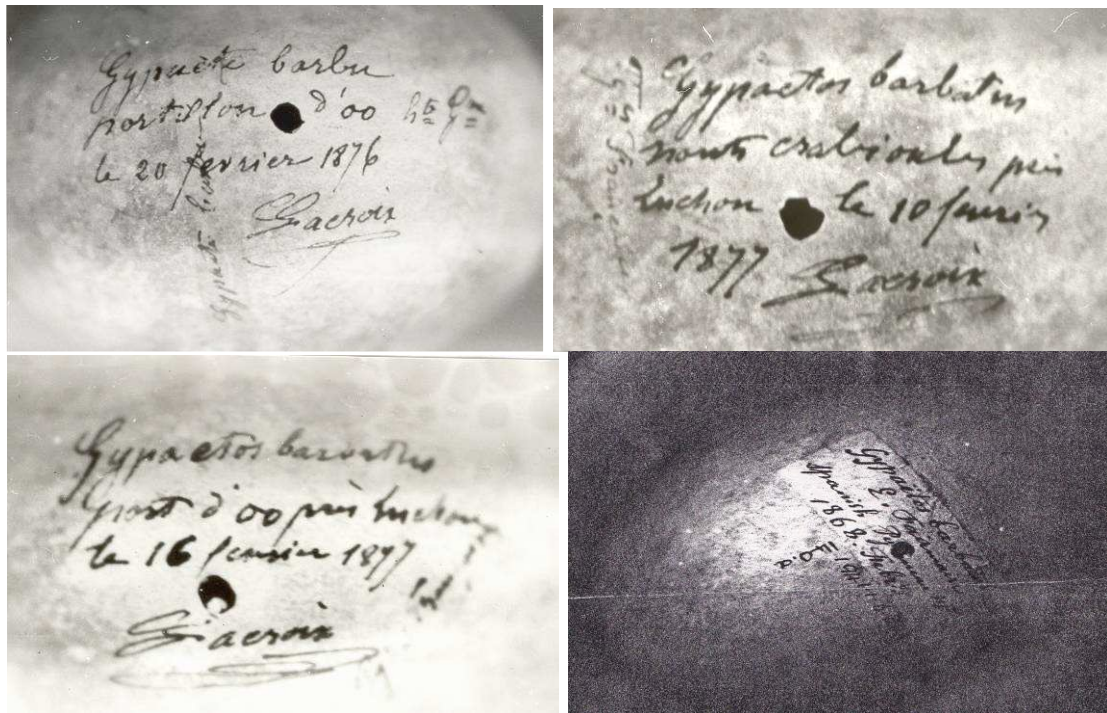


Imagen 4.1.: Situación del área de estudio y divisiones administrativas. La población de Quebrantahuesos está distribuida en la porción central del Pirineo axial, el Pirineo navarro, la vertiente norte del Pirineo central, las sierras exteriores de Aragón y el pre-Pirineo de Lleida.

El área de distribución en el conjunto de los Pirineos comprende una superficie aproximada de 21.000 km², enmarcada en un rectángulo de unos 300 km de longitud E-W por 110 km de longitud N-S (Heredia, 1991a). Esta área abarca territorios en tres países (España, Francia y Andorra) y, dentro de España, tres Comunidades Autónomas (Navarra, Aragón y Cataluña). Dentro del área de distribución en España tradicionalmente se distinguían tres subpoblaciones, Pirenaica, Prepirenaica y de Sierras Exteriores; sein embargo, en el presente trabajo hemos diferenciado cuatro regiones en base a sus características ecológicas y biogeográficas: 1) Pirineo axial (Central y Oriental), 2) Pirineo Navarro, 3) Sierras Exteriores Aragonesas y 4) Prepirineo leridano. La mayor parte de la población se encuentra en Pirineo axial (alrededor del 46 % de los territorios). El resto se reparte entre las Sierras Exteriores Aragonesas y el Prepirineo leridano, contando el Pirineo Navarro con un censo que ha variado entre 1 y 5 territorios en las últimas décadas.

Desde 1985 y, mas intensamente desde 1988, en la población española todos los años, de noviembre a agosto, se visitan los territorios ocupados por parejas reproductoras, realizando de 2 a 3 visitas por cada temporada de cría, coincidiendo con la pre-puesta, la incubación y la crianza del pollo (Carrete et al., 2006). Los territorios

potenciales son también revisados y, al igual que los territorios ocupados, la revisión incluye la identificación de los reproductores, la revisión de los nidos de la pareja, el comportamiento territorial o los signos de ocupación del nido elegido (Margalida et al., 2014) así como la determinación de los parámetros reproductivos (ver Margalida et al., 2003 para detalles). Se consideró un territorio ocupado cuando se registró un intento de cría o comportamiento territorial por parte de los adultos. La observación de los nidos se realizó con la ayuda de telescopios con 20X60 aumentos o con videocámaras. Se consideró una reproducción con éxito cuando se observó al final de la época de cría la presencia de un pollo desarrollado. Se define la "*Productividad*" como el número de pollos que vuelan con éxito en relación a las parejas reproductoras y el "*Éxito reproductor*" como el número de pollos que vuelan con éxito en relación a las parejas que realiza puesta.



Imágenes 4.2.-4.5.: Identificación de alguno de los huevos localizados en diversos museos europeos. Inferior derecha, British Museum Natural History, Tring, Hertfordshire, UK. Resto, Museum d'Historie Naturelle de Toulouse, Francia.

4.2 Material estudiado

Las muestras de huevos se obtuvieron durante las visitas a los nidos una vez que se constataba el fracaso reproductor en las parejas en las que la reproducción estaba monitorizada. Únicamente se han analizado huevos abandonados o infértiles y el acceso a los nidos lo realizó únicamente personal autorizado del Ministerio de Medio Ambiente, los Agentes Rurales de la Generalitat de Cataluña, el Guarderío Forestal del Gobierno de Navarra, los Agentes de Protección de la Naturaleza del Gobierno de Aragón, los miembros del Grupo de Rescate y de Montaña (GREIM) de la Guardia Civil, así como técnicos pertenecientes o adscritos a las diferentes administraciones españolas y francesa, en el marco de los Planes de Recuperación o de actuación de la especie.

No se han colectado huevos al azar o huevos viables por el estatus de protección de la especie, lo que constituye un posible sesgo en el muestreo. Los huevos se retiraban del nido tras un periodo prudencial de dos semanas después de la fecha prevista de nacimiento, excepto en aquellos casos en los que era evidente el abandono o la puesta corrían grave riesgo de predación o de perderse. En cualquier caso, los huevos eran trasladados tras la retirada a los correspondientes Centros de Recuperación de Fauna oficiales en incubadoras portátiles y, tras el pesado y medición, fueron incubados durante varios días para confirmar el fracaso.

En el caso en que durante la intervención del nido tras el fracaso, no se encontraran huevos enteros o fragmentados, se retiraba todo el material presente en el nido, incluido el cuenco del propio nido, para ser examinado mas detalladamente en el Centro de Recuperación en busca de fragmentos de cáscara.



Imágenes 4.6. y 4.7.: Muestras obtenidas en los restos de un nido de la provincia de Lleida en 2003 durante la intervención tras el fracaso reproductor. A la izquierda, fragmentos de cáscara encontrados; a la derecha otros restos de interés: plumas de presas, pezuñas de ovino, restos de huesos y "tizas" (excrementos de Quebrantahuesos con un alto contenido en carbonato cálcico).

Se ha estudiado también material (restos de cáscaras) de nidos inspeccionados tras la reproducción exitosa, por lo que no todo el material estudiado pertenece a puestas o reproducciones fallidas.

4.2.1. Material estudiado depositado en museos

En total se han localizado en los diversos Museos de Historia Natural y Colecciones consultadas un total de 75 huevos de Quebrantahuesos pertenecientes a 57 puestas diferentes y colectadas entre 1.860 y 1.911. Veinticinco de las puestas (28 huevos) fueron colectadas en diferentes localizaciones de los Pirineos Españoles y franceses, 28 puestas (43 huevos) en el Sur de la Península Ibérica y 4 puestas únicas fueron colectadas en la Península Ibérica, pero se desconoce la localidad.

De los huevos depositados en museos, obtuvimos autorización para la toma de muestras de 8 de ellos (Tabla 1), 4 de los 5 depositados en el Museo de Historia Natural de Toulouse (Francia) –el quinto huevo resultó ser un réplica en escayola-, por cortesía de

Mdme. Claudine Sudre y el Dr. P. Dalous, de los 2 depositados en el Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig de Bonn (Alemania), por cortesía del Dr. Goetz Rheinwald, del depositado en el Museo de Historia Natural de Ginebra (Suiza), por cortesía del Dr. Louis de Roguin y del depositado en el Museo de Historia Natural de Berna (Suiza), por cortesía de los Dres. B. Blochlinger y H. Güntert.

En el Anexo I se ofrecen los datos referentes al número de registro, procedencia, fecha de colecta y número de huevos de la puesta de todos los huevos existentes en las diferentes colecciones obtenidos de la población ibérica y empleados en el estudio morfométrico. Se incluye también una relación de los huevos que se han perdido en las diferentes colecciones y que actualmente se hallan en paradero desconocido (Anexo II).

Name:	<i>Gypaetus barbatulus</i>
Gelege:	<i>2</i> Dat. <i>6/06</i> № <i>2</i>
Fundort:	<i>Sierra Ronda</i> <i>Spanien</i>
Wilh. Schlüter, Halle a. S. Naturalien- und Lehrmittelhandlung.	

Name:	<i>Gypaetus barbatulus</i>
Gelege:	<i>1</i> Dat. <i>27/09</i> № <i>675</i>
Fundort:	<i>Sierra Ronda</i> <i>bei Málaga, Spanien</i>
Wilh. Schlüter, Halle a. S. Naturalien- u. Lehrmittelhandlung.	

Imágenes 4.8. y 4.9.: Etiquetas de dos huevos de Quebrantahuesos colectados en 1.906 y 1.909 en Ronda (Málaga), de la colección del British Museum Natural History, Tring, Hertfordshire, UK. Los huevos eran objeto de comercio entre coleccionistas. Se desconoce el número de huevos de Quebrantahuesos que puede haber en colecciones privadas.

Fueron consultados y se solicitó la toma de muestras, además, en los siguientes museos:

- British Museum Natural History, Tring (Inglaterra), en el que existen 28 huevos de *Gypaetus barbatus*, correspondientes a 22 puestas procedentes de España y Francia colectados entre 1864 y 1909 (Dr. Michael P. Walters y Dra. M. L. Guerin, comm. pers.).
- Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, Bonn (Alemania), que conserva 25 huevos de *Gypaetus* procedentes de España y Francia colectados entre 1877 y 1908. De ellos, hemos estudiado muestras de 2 colectados en los Pirineos en 1913 y 1929 y cedidos amablemente por el Dr. Goetz Rheinwal.
- Museum National d'Historie Naturelle de Paris (Francia), en el que existen dos huevos procedentes de una misma puesta de Andalucía, colectada el 6.01.1884.
- Staaliches Museum für Naturkunde, Stuttgart (Alemania), que cuenta en sus colecciones con dos huevos de dos puestas diferentes procedentes de los Pirineos españoles (1860) y franceses (Le Vignemale, 1854).

- Rijksmuseum van Natuurlijke Historie, Leiden (Holanda), en el que se localizaron 5 huevos de la especie procedentes de 4 puestas colectadas en Andalucía entre 1877 y 1908.
- Natur-Museum Senckenberg, Frankfurt (Alemania), en el que hay depositada una única puesta de dos huevos procedente del SW de España y colectada en 1897.
- Museum für Naturkunde, Humboldt Universität, Berlin (Alemania), que conserva una única puesta de dos huevos procedente del sur de España y colectada en 1888.

Museo	Fecha	Datos de la etiqueta
ZFMAK	06.02.1893	<i>Le Vignemale (Pyrénées Françaises). 6.II.1893 ex coll. De la Fauchais-Agnau</i>
ZFMAK	21.03.1877	<i>Pyrenäen, 21.III.1877. ex. Coll. Ecke</i>
MHNG	1868	<i>Pyrénées in L. Nicoud collection 1868</i>
MHNB	28.03.1907	<i>Vultur monachus. 3-2r Spanien Pyrenäen 1626 B, Pyrénées, Spain.</i>
MHNT	16.02.1877	<i>Port D'Oo, 16.Feb.1877. Lacroix</i>
MHNT	20.01.1876	<i>Portillon D'Oo, Hte Gne, 20.Janv.1876 Lacroix</i>
MHNT	10.01.1877	<i>Mount Cabrioules, Luchon. 10.Janv.1877. Lacroix</i>
MHNT	1875-1907	<i>Bayonne, France.</i>

Tabla 1: Huevos de los que se obtuvo una muestra de cáscara para el estudio ultraestructural. ZFMAK, Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, MHNG, Museo de Historia Natural de Ginebra, MHNB, Museo de Historia Natural de Berna y MHNT, Museo de Historia Natural de Toulouse.

Además, se consultaron los siguientes museos:

- Museu de Zoologia de la Universitat de Barcelona, en la que no existe ningún huevo de *Gypaetus barbatus* depositado (Dra. Eulalia García, comm. pers.).
- Colección de la Estación Biológica de Doñana, CSIC, Sevilla, en la que tampoco se conserva ningún huevo de la especie (Dr. José Cabot, comm. pers.).

- Zoology Museum of University of Zurich (Suiza), en el que ya no se conservan huevos de la especie según nos informó el Dr. Marcel Güntert del Natural History Museum Bern (Suiza).
- Museum d'Historie Naturelle de Nantes (Francia), en el que el único huevo de *Gypaetus barbatus* procedía realmente de Argelia y fue colectado en el año 1.934 (Dra. Marie-Laure Guerin, comm. pers.).
- Western Foundation of Vertebrate Zoology, Los Angeles, California (USA), que según nos informó amablemente el Dr. Lloyd Kiff no hay huevos de *Gypaetus barbatus* procedentes de la Península Ibérica ni de los Pirineos franceses.
- Museo Nacional de Ciencias Naturales (CISIC), Madrid. En las colecciones del museo hay depositados únicamente tres huevos de *Gypaetus barbatus*, de acuerdo con la información facilitada por la Dra. Josefina Barreiros. Estos tres huevos pertenecen a dos puestas de la provincia de Huesca colectados en 1990 y han sido incluidos en la muestra de huevos actuales.

4.2.2. Material obtenido en el periodo actual

Se ha estudiado la ultraestructura de la cáscara de 90 huevos de Quebrantahuesos colectados en los Pirineos entre 1990 y 2013, de los que 63 corresponden a fragmentos de cáscara y 27 a huevos encontrados enteros. Las 90 muestras corresponden a 49 territorios, de los cuales 10 fueron muestreados 4 veces en estos 23 años, 8 territorios fueron muestreados 3 veces, 12 fueron muestreados 2 veces y 19 territorios se muestrearon una única vez. Las hembras reproductoras no estaban marcadas en ninguno de los territorios estudiados, por lo que han podido variar a lo largo de los años en los territorios donde se muestreó varias veces el mismo nido.

Región	Cáscaras	Huevos	Total
Lleida	36	12	48
Huesca	15	14	29
Navarra	9	1	10
Francia	4	0	4
Total	63	27	90

Tabla 2: Muestras de cáscaras y huevos completos obtenidos para el estudio en el periodo 1990-2013 en la población española y francesa.

Del total de muestras estudiadas, un 53.33 % fueron colectadas en la provincia de Lérida, un 32.22 % en la provincia de Huesca, un 10.0 % en la Comunidad Foral de Navarra y un 4.44 % en los Pirineos franceses (Tabla 2). Se han clasificado las muestras según su procedencia en función de las subpoblaciones de Quebrantahuesos establecidas, en vez de en función de criterios administrativos (provincias). Así, 35 (38.89 %) muestras

se colectaron en el Pirineo Axial, 33 (36.67 %) en el Prepirineo de Lleida, 13 (14.44 %) en las Sierras exteriores de Huesca y 9 (10.0 %) en el Pirineo Navarro.

Periodo	n	%
1990-1995	14	15.56
1996-2000	19	21.11
2001-2005	28	31.11
2006-2013	29	32.22

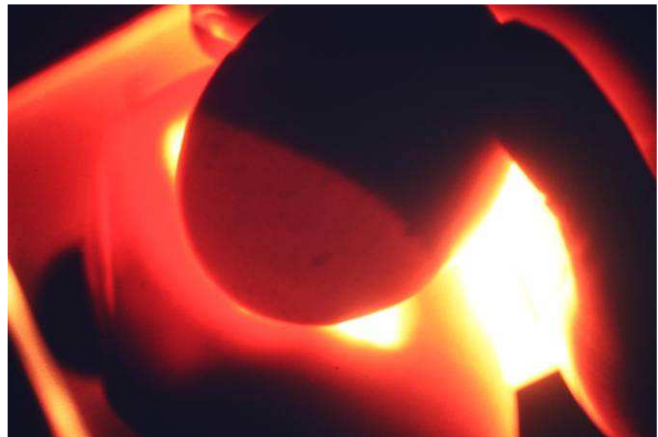
Tabla 3: Muestras obtenidas en el estudio y distribución en los diferentes periodos establecidos.

Para el estudio estadístico, las muestras se han dividido en 4 periodos que coinciden con eventos demográficos: 1990-1995, periodo expansivo de la población; 1996-2000, periodo de crecimiento sostenido de la población y aparición de episodios de mortalidad adulta y subadulta por veneno; 2001-2005 estancamiento de la población y incidencia máxima de la mortalidad por veneno; y 2006-2013 periodo de regresión y empaquetamiento de la población (Oro et al., 2008). De las 90 muestras estudiadas, un 15.56 % pertenecían al primer periodo, un 21.11 % al segundo, un 31.11 % al tercero y un 32.22 % al último (Tabla 3).

4.3. Métodos

4.3.1. Examen patológico y necropsia de huevos

Los huevos, tras la retirada, eran trasladados a los correspondientes Centros de Recuperación de Fauna oficiales en incubadoras portátiles y, tras el pesado y medición, fueron incubados durante varios días para confirmar el fracaso. Cuando éste se confirmaba, se procedía a la realización de la correspondiente necropsia para determinar la causa de la muerte embrionaria si era fértil.



Imágenes 4.8. y 4.9.: Huevo en la incubadora para comprobar su viabilidad antes de ser analizado. Derecha, examen del interior del huevo con ovoscopio; se observa la cámara de aire.

El examen externo del huevo comprende la inspección ocular y el examen del contenido mediante ovoscopio, para determinar la fertilidad, desarrollo embrionario o la extensión de la cámara de aire. Se registra fotográficamente el diseño externo de la cáscara en todos los huevos estudiados, así como el estado en que fueron rescatados del nido y se examina la cáscara con detenimiento para la detección de fisuras, alteraciones o irregularidades.



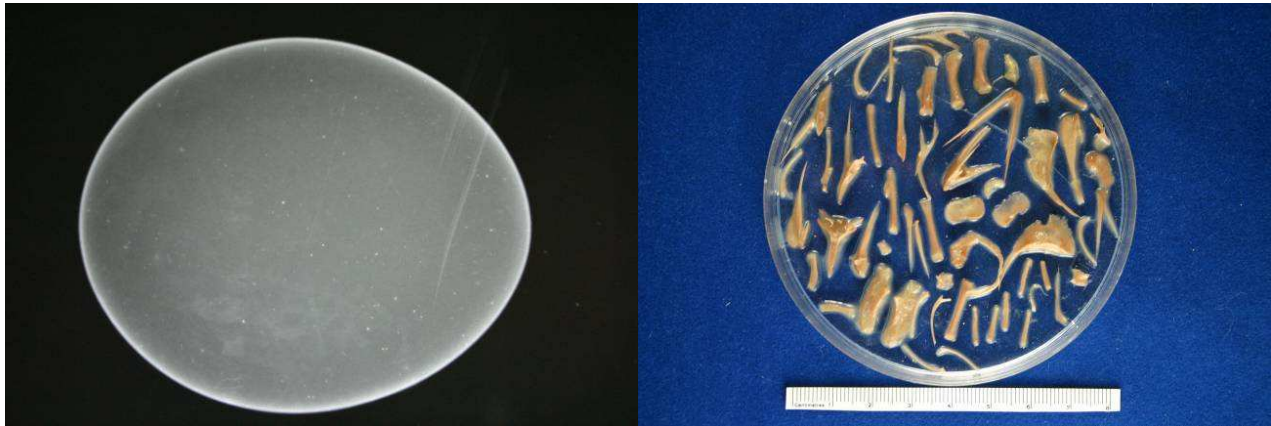
Imágenes 4.10. y 4.11.: Apertura del huevo para examinar el contenido (izquierda) y embrión abortado en el último tercio de la incubación. En ocasiones no es posible determinar la muerte embrionaria con total seguridad hasta que el huevo ha sido incubado unos días en la incubadora.



Imágenes 4.12. y 4.13.: Embrión de un huevo abortado al final de la incubación al ser abandonado por molestias en el nido en la provincia de Huesca en 2003. Derecha, necropsia de un pollo recién nacido muerto por causas naturales (Huesca, 1995).

Tras el examen externo, la medición y el pesaje, se abre el huevo con la ayuda de una sierra circular y se examina el contenido, registrando todos los hallazgos fotográficamente. El contenido del huevo se extraía a través del orificio practicado. La pieza de cáscara extraída se conservaba con el resto de la cáscara. En el caso de huevos embrionados, se realiza una necropsia del embrión para determinar la edad y las causas de la muerte, realizándose en caso necesario, cultivo microbiológico del contenido y, si el embrión está fresco, el estudio histopatológico.

Una vez analizado el contenido, la cáscara, incluyendo la pieza cortada para la extracción del contenido, se lavaba con agua destilada y se secaba en estufa a 110 °C durante tres días para su conservación en recipientes herméticos.



Imágenes 4.14. y 4.15.: Radiografía de un huevo embrionado retirado dos semanas después de la fecha prevista de eclosión en la que se observan restos óseos desorganizados. Al realizar la necropsia se encontró la descomposición aséptica de los tejidos blandos del embrión.

4.3.2. Morfometría

La longitud y la anchura máximas de los huevos se determinaron con la ayuda de un calibre vernier con una precisión de 0.01 mm. El volumen del huevo se determinó a partir de las medidas de longitud y anchura utilizando la fórmula de Stonehouse (1966):

$$V (mm^3) = 0.512 Longitud \times Anchura^2$$

El peso fresco del huevo se calculó con la fórmula de Hoyt (1979):

$$W = K_w Longitud \times Anchura$$

donde K_w es una constante, que en falconiformes tiene un valor de 0.0005474 (Burhnam 1983).

El peso de la cáscara se determinó tras el secado de la cáscara a 110 °C en estufa, utilizando una báscula electrónica de 0.001 g de precisión (EKG200G, A&D Instruments, Yokohama, Japón). El volumen del contenido se calculó con la fórmula (Massaro y David, 2004):

$$V_c = 0.512 (Longitud - espesor de la cáscara) \times (Anchura - espesor de la cáscara)^2$$

El volumen de la cáscara se obtuvo restando el volumen del contenido al volumen del huevo ($V_s = V - V_c$).

El *Índice de Ratcliffe* (1970) se determina como la relación entre las dimensiones del huevo y el peso de la cáscara, incluyendo las membranas, utilizando la fórmula:

$$RI \text{ (mg/mm}^{-2}\text{)} = \text{Peso de la cáscara} \div (\text{Longitud} \times \text{Anchura})$$

4.3.3. Análisis ultraestructural de la cáscara

La ultraestructura de la cáscara fue estudiada en todos los fragmentos obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando tres fragmentos de 3 mm² del ecuador del huevo. El primero permitía estudiar la superficie externa del huevo; el segundo, tras la digestión de las membranas con NaOH durante 1 hr., se empleaba en el estudio de la superficie interna de la cáscara y los conos basales. Un tercer fragmento se empleaba en el estudio del corte transversal y se obtenía tras realizar una fractura mecánica fresca. Las muestras se montaron en un soporte de aluminio y se recubrieron con una capa de oro a 15 Ma en una atmósfera de argón. El microscopio electrónico empleado fue un Philips Modelo KX-20 (Philips Electronics Nederland, Eindhoven, Holanda), con un voltaje de aceleración de 10-15 Kvol. Se obtuvieron microfotografías con 220 a 400 aumentos.

El espesor de la cáscara y de las diferentes capas (mamilar, palizada y reticular) así como la anchura y la altura de los conos basales, se determinó como la media aritmética de 5 medidas realizadas en el corte transversal.

El *Índice de Cooke* (1979) se determinó como la relación entre la altura de los conos basales y el espesor de la capa mamilar:

$$IC = \text{Altura Conos basales} \div \text{Espesor Capa Mamilar}$$

En el fragmento utilizado para examinar la cara interna de la cáscara, los conos basales y los núcleos mamilares, se determinó el diámetro medio de los macroporos como la media aritmética del diámetro de 10 macroporos medido en la parte interna y seleccionados al azar. Igualmente, a través de microfotografías de 400 aumentos, se calculó el *Número de Poros* por unidad de superficie (mm²). Para obtener el *Número Total de Poros* en cada huevo, se calculó primero la *Superficie Total de la Cáscara* utilizando la fórmula de Hoyt (1976):

$$S \text{ (mm}^2\text{)} = [4.393 + 0.394 \text{ Longitud} \times (\text{Anchura}^{-1})] (\text{V}^{0.667})$$

Una vez obtenida la Superficie Total de la Cáscara, se calculó el Número Total de Poros como el producto entre la Superficie Total de la Cáscara y el Número de Poros por mm².

Para obtener el *Área Funcional de Poros Total* (*Ap*) en cada cáscara, se multiplicó el área media de los poros por el *Número Total de Poros*. Así, se pudo calcular la *Conductancia al Vapor de Agua* (G_{H2O}) de acuerdo con la fórmula de Ar et al. (1974):

$$G_{H2O} = 23.42 \text{ Ap} \div \text{Espesor de la Cáscara}$$

La fertilidad y el grado de desarrollo embrionario en los huevos colectados enteros se determinaron en el examen patológico durante la necropsia. En los casos en los que sólo se disponía de fragmentos de cáscara, se determinaron examinando el desgaste de los conos basales en la cara interna de la cáscara.

La *Dureza de la Cáscara* se calculó utilizando el RI de acuerdo con la fórmula (Ar et al., 1974):

$$D = 577 RI - 362$$

Por último, algunos huevos están cubiertos de una fina capa de barro impregnada durante la incubación por contacto con el plumaje. El espesor de esta capa de barro se determinó como la media aritmética de cinco medidas tomadas a 400 aumentos en el corte transversal. El análisis semicuantitativo de la composición de la cáscara o del barro que impregna el exterior se realizó mediante el analizador de energía dispersiva de Rayos X (energy-dispersive X-Ray microanalysis - EDDAX-) acoplado al microscopio electrónico. Se estableció un índice de impregnación como la relación entre el espesor de esta capa de barro y la cantidad de Ca detectado, asumiendo que todo el calcio cuantificado tiene su origen en la cáscara y no en el barro.

4.3.4. Análisis de pesticidas

Se han analizado los niveles de pesticidas de 20 huevos retirados enteros en los Pirineos entre 1990 y 2012. Las muestras obtenidas en la necropsia de los huevos, se conservaron congeladas a - 20 °C hasta el momento de sus análisis. Los análisis de pesticidas se realizaron en el Laboratorio Forense de Vida Silvestre (Las Matas, Madrid). El contenido del huevo se extraía a través del orificio realizado en la cáscara para el examen del contenido, con la ayuda de una sierra circular.

Los análisis de pesticidas organoclorados incluidos PCBs se realizaron en el contenido del huevo mediante Cromatografía de Gases con detector de captura de electrones (GOW MAC Series 600, GOW MAC Instrument Co, Bethlehem, PA, USA) según el método de análisis EPA 608 (Hernández et al., 2008). Se ha mantenido la misma metodología de análisis a lo largo del periodo de estudio.

El contenido del huevo, incluidos los restos del embrión tras la necropsia, se homogenizaron con sulfato sódico anhidro, se extrajeron con éter de petróleo y la ayuda de un extractor Soxhlet y se purificaron en un cartucho de extracción en fase sólida de florisil (Strata FL-PR Florisil, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Se cuantificaron los niveles de α , β y γ hexaclorociclohexano (HCH); los isómeros *o,p'*- y *p,p'* del dicloro difenil tricloroetano (DDT), del dicloro difenil dicloroetano (DDD) y del dicloro difenil dicloroetileno (DDE); de aldrin, dieldrin, endrin, heptacloro, heptacloro epóxido, α y β endosulfán, endosulfán sulfato, hexaclorobenceno, mirex, oxiclordano y α y β clordano. Los diferentes pesticidas organoclorados y los congéneres de PCBs se determinaron comparando los tiempos de retención relativos de los picos desconocidos con los picos de una solución estándar (Pesticides Mix Solution y Aroclor 1254 Solution; Supelco, St. Louis, MO; USA) utilizando diclorometano como patrón interno. Las concentraciones de los PCBs se determinaron calculando el área del pico que coincidía con los picos del estándar de

Aroclor 1254. Se emplearon diferentes estándares para cada pesticida organoclorado para calcular los factores de respuesta para cada analito por separado. Los controles de calidad se realizaron usando el contenido de un huevo de gallina fortificado con cada analito después de la extracción y análisis siguiendo la misma metodología (Hernández et al., 2008). Los porcentajes de recuperación de cada analito variaron desde el 67 % del hexaclorobenceno y el 116 % del heptacloro epóxido. El límite de detección de los pesticidas fue de 0.001 µg/g, a excepción del endosulfán sulfato y el α y β clordano que fue de 0.005 µg/g, y entre 0.003 y 0.005 µg/g para todos los congéneres de PCB's, excepto para los isómeros 8, 18 y 28 en los que fue 0.015 µg/g.

Tras el análisis, la concentración de los organoclorados no fue corregida con el porcentaje de recuperación. La concentración de pesticidas se expresa en µg/g de peso húmedo para evitar la influencia que tiene la presencia y desarrollo del embrión sobre la concentración de organoclorados (Newton y Bogan, 1978; Peakall y Kiff, 1979), el efecto de la putrefacción en el contenido lipídico (Helander et al., 2002) o el efecto de la pérdida de parte del contenido (Hernández et al., 2008). Debido a que no se disponía del peso del contenido del huevo en el momento de iniciarse la incubación, no fue posible ajustar la concentración de pesticidas con la pérdida de humedad debido a la deshidratación tras la incubación, lo que puede suponer un sesgo en la muestra (Hernández et al., 2008).

4.3.5. Análisis estadístico

Los valores biométricos macroscópicos y ultraestructurales se expresan como la media aritmética \pm la desviación estándar y el rango de variación. Los niveles de los pesticidas organoclorados se expresan como la media geométrica \pm la desviación estándar y el rango de variación. Los pesticidas detectados por debajo del límite de cuantificación se les asignó un valor de 0.001 µg/g para el análisis estadístico. Los cambios temporales se analizaron considerando cuatro periodos: 1900-1995, periodo expansivo de la población; 1996-2000, periodo de crecimiento sostenido de la población e inicio de la mortalidad por veneno; 2001-2005 estancamiento de la población y incidencia máxima de la mortalidad por veneno; y 2006-2013 periodo de regresión y empaquetamiento de la población (Oro et al., 2008). Se estudió la variación de los parámetros en función de la población, la fertilidad, y el orden de puesta y su variación temporal. Se consideraron los huevos dentro de una misma puesta como variables independientes. Para el análisis estadístico se empleó una t-test de una variable para comparar las diferencias entre huevos fértiles e infértiles y un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las diferencias en los parámetros entre los grupos establecidos (orden de puesta, subpoblaciones y periodos). Cuando los resultados del ANOVA arrojaron diferencias estadísticamente significativas, se empleó un test de Duncan para identificar las diferencias entre grupos. La diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $p > 0.005$. Los análisis estadísticos se realizaron con el software STATISTICA Statsoft (Uppsala University, Uppsala, Suecia).

CAPITULO 5. RESULTADOS

5.1. Estudio de los huevos antiguos depositados en Museos

5.1.1. Biometría de los huevos antiguos

Se han estudiado la biometría de 68 huevos antiguos depositados en diferentes museos y de los que se conocía la procedencia. Se han dividido en dos poblaciones, Pirineos y Andalucía para determinar si existían diferencias en la morfometría de los huevos entre ambas poblaciones, si es que realmente se trataba de dos poblaciones. Los datos morfométricos de ambos grupos y globales se expresan en la Tabla 5.1.

	n	X \pm SD	Min	Max
Museos				
Longitud	68	82.96 \pm 72.5	72.5	96.4
Anchura	68	65.82 \pm 2.42	60.7	72.4
Peso Fresco	68	197.51 \pm 22.93	161.54	275.60
Andalucía				
Longitud	45	83.06 \pm 4.11	72.5	96.4
Anchura	45	65.78 \pm 2.11	60.7	72.4
Peso Fresco	45	197.61 \pm 10.3	161.54	276.60
Pirineos				
Longitud	23	82.80 \pm 4.09	75.9	91.8
Anchura	23	65.88 \pm 2.32	64.2	71.9
Peso Fresco	23	197.34 \pm 10.1	171.21	259.78

Tabla 5.1: Biometría de los huevos depositados en museos en conjunto y divididos según su procedencia (Andalucía y Pirineos).

En ninguno de los tres parámetros (longitud, anchura y peso fresco) se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los huevos colectados en el Sur de España y los huevos colectados en los Pirineos (t -Student, $P > 0.05$)

5.1.2. Ultraestructura de la cáscara de los huevos antiguos

La cáscara de *Gypaetus barbatus* puede ser clasificada como trilaminar y reticular, según la clasificación de Board (1982), es decir, que la porción calcificada de la cáscara se compone de tres capas, esponjosa, palizada y mamilar, siendo la externa de tipo reticular. Igualmente, los macroporos que atraviesan la cáscara son de tipo tubular simple (Tyler, 1969; Bland, 1992), como ha sido descrita en todas las falconiformes. No se ha encontrado en ninguna de las cáscaras estudiadas la capa cristalina superficial (Cooke, 1989; Bland, 1992). La cara externa de todos los huevos se encontraba muy alterada por la acción de la humedad, de las bacterias y de los hongos, por lo que no se ha podido estudiar la cutícula externa ni la composición de la cara externa de la cáscara de la mayoría.

En todas las cáscaras estudiadas la ausencia de desgaste de los conos basales indicaba que la colecta de huevos se realizaba al principio de la incubación.

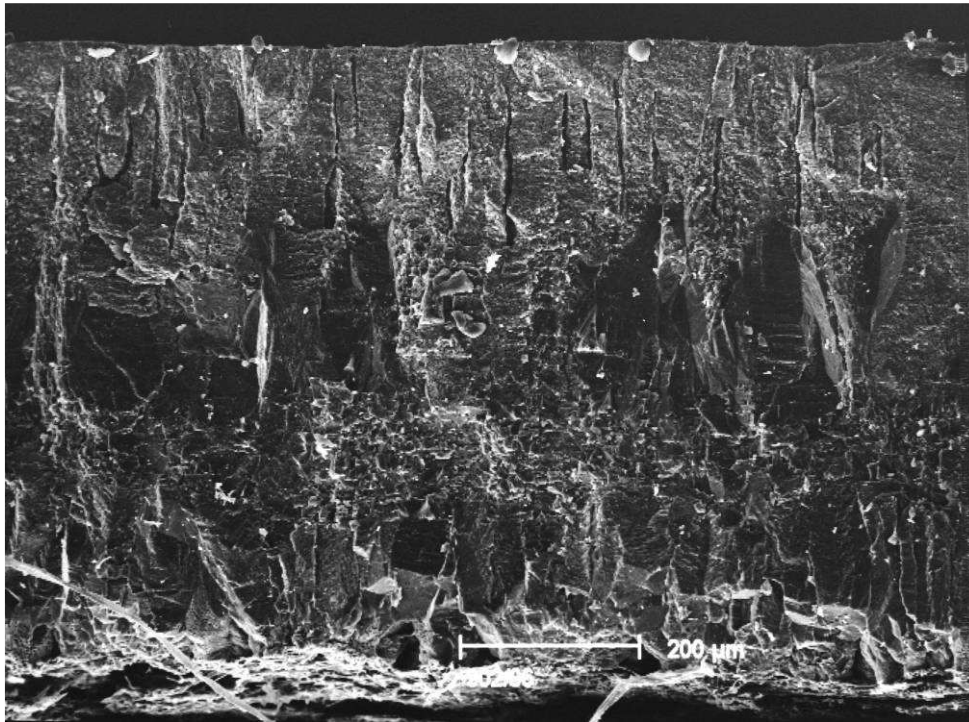


Imagen 5.1.: Corte transversal de la cáscara del huevo depositado en el MHNB y colectado en 1.907. Se observan las tres capas, aunque la capa mamilar está algo degradada.

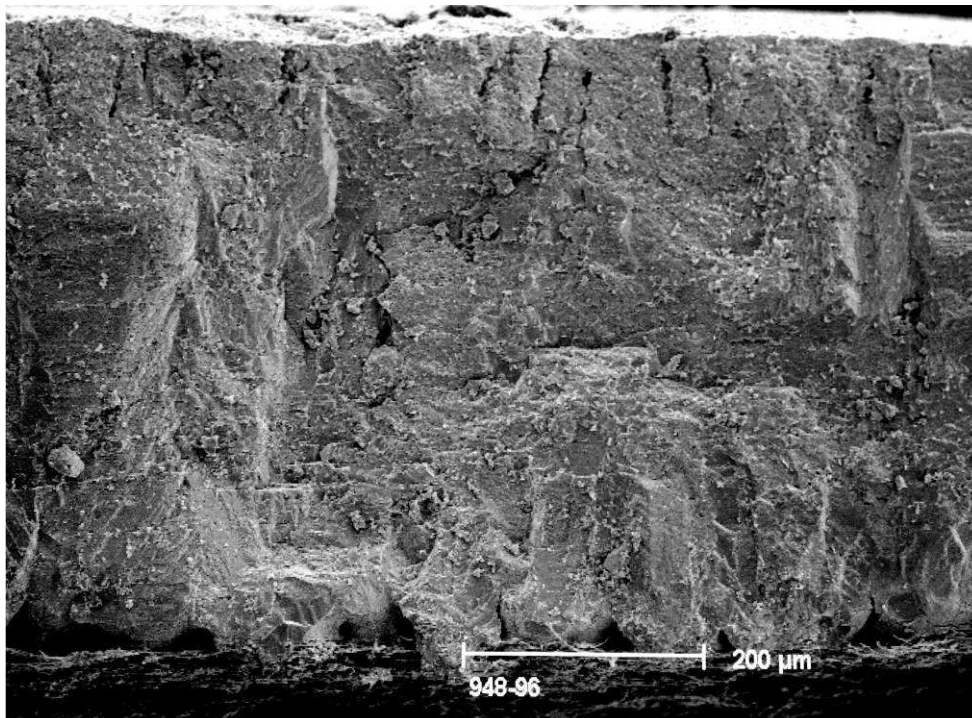


Imagen 5.2.: Corte transversal de la cáscara del huevo depositado en el MHNT y colectado en 1.877. Se observa la ausencia de desgaste en los conos basales.

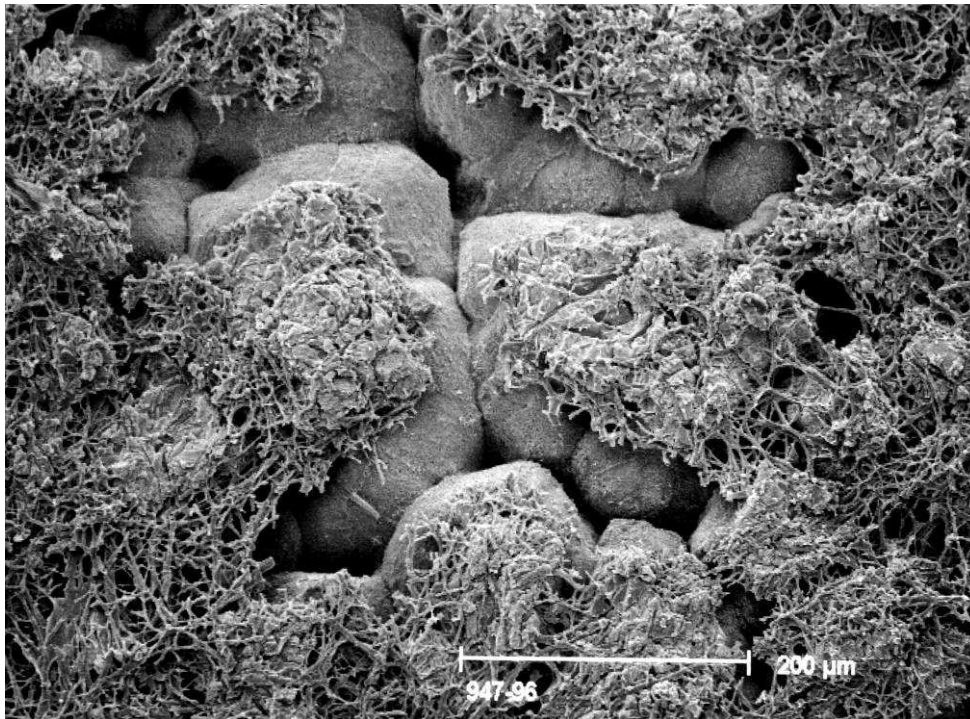


Imagen 5.3.: Conos basales de la cáscara del huevo depositado en el MHNT y colectado en 1.876 donde se observa la ausencia de desgaste.

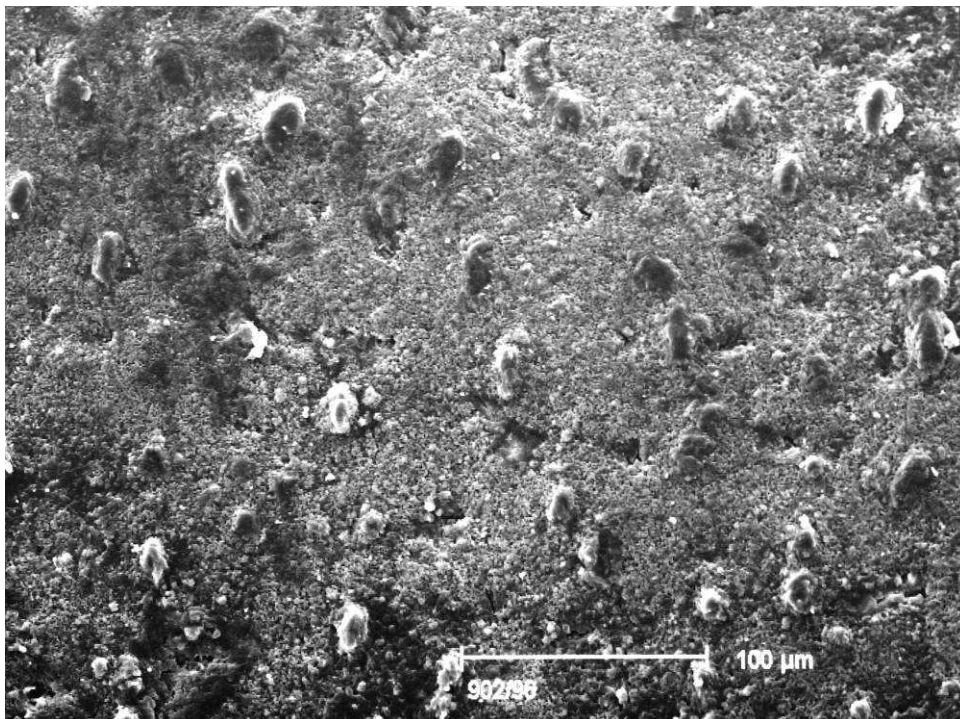


Imagen 5.4.: Superficie externa de la cáscara del huevo depositado en el MHNB y colectado en 1.907. Se observa la presencia de bacterias.

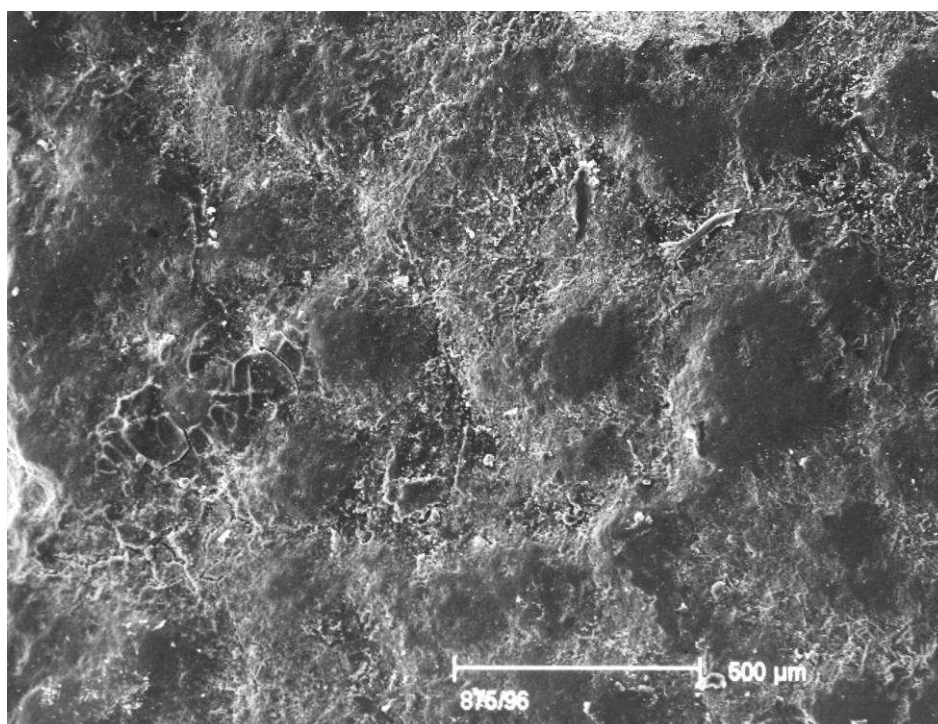


Imagen 5.5.: Superficie externa de la cáscara del huevo depositado en el MHNG y colectado en 1.868. Se observa la presencia de restos de barro ferruginoso como en los huevos actuales.

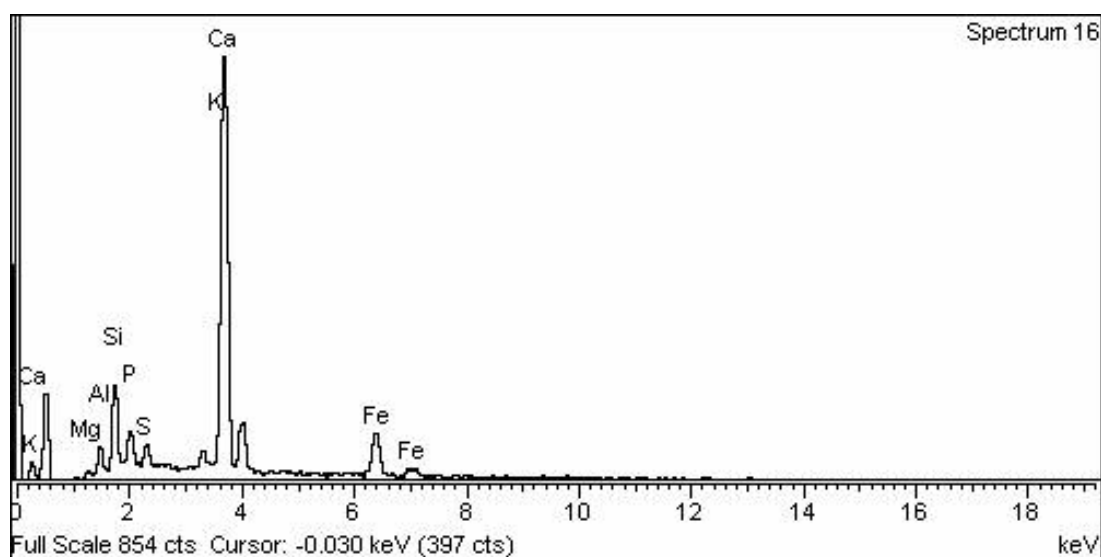


Imagen 5.6.: Espectro de la composición semicuantitativa de los restos de barro que impregnaban la superficie externa de la cáscara MHNG de 1.868 en el que se observa la presencia de hierro y los mismos elementos y en las mismas proporciones que en los huevos actuales.

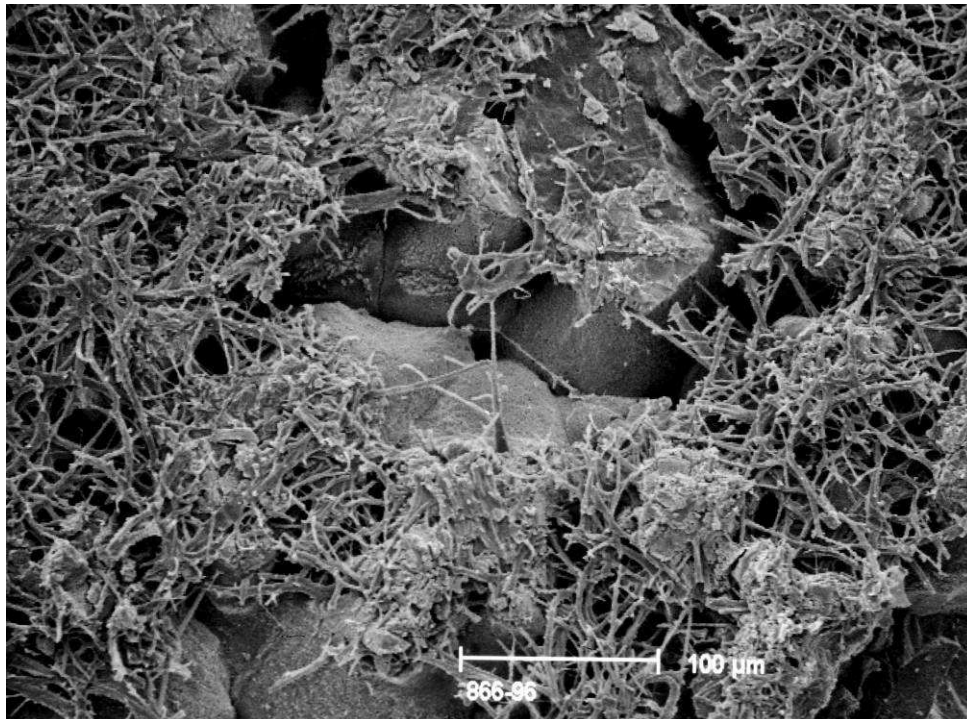


Imagen 5.7.: Conos basales de la cáscara del huevo depositado en el ZFMK y colectado en 1.877 donde se observa la ausencia de desgaste y, por lo tanto la ausencia de desarrollo embrionario a pesar de ser colectado a finales de marzo.

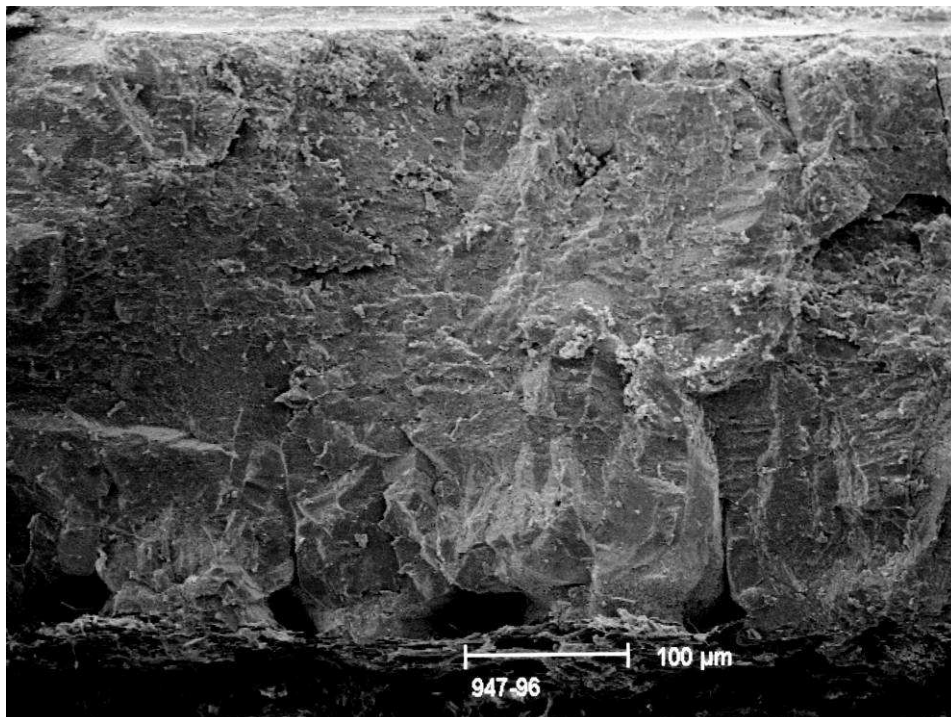


Imagen 5.8.: Corte transversal de la cáscara del huevo depositado en el MHNT y colectado en 1.876 donde se observa la ausencia de desgaste de los conos basales.

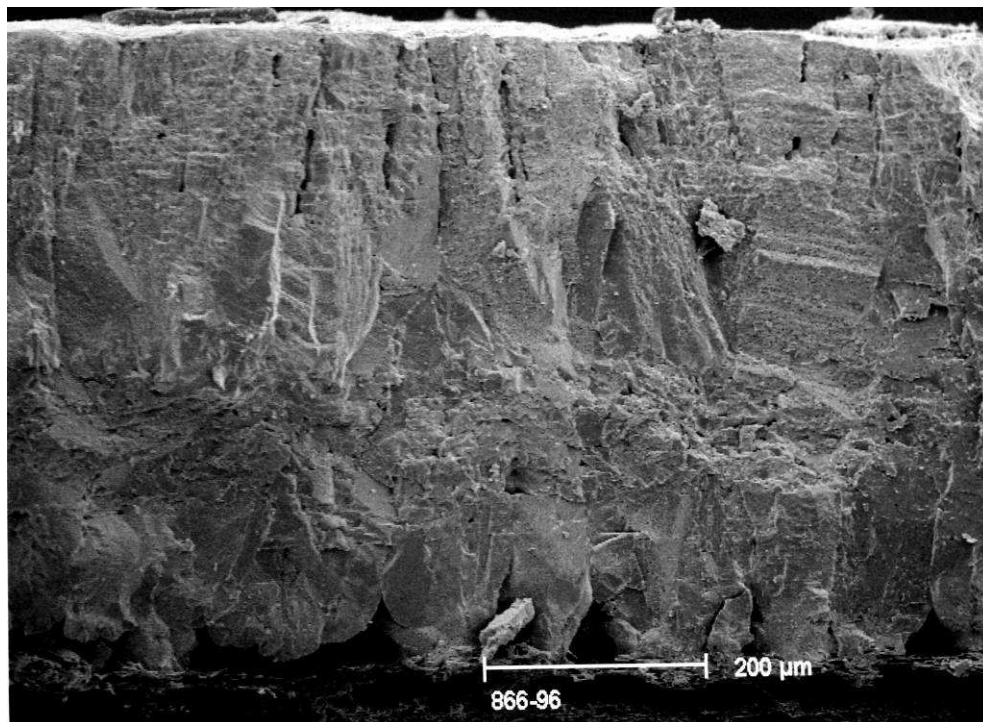


Imagen 5.9.: Corte transversal de la cáscara del huevo depositado en el ZFMK y colectado en 1.877.

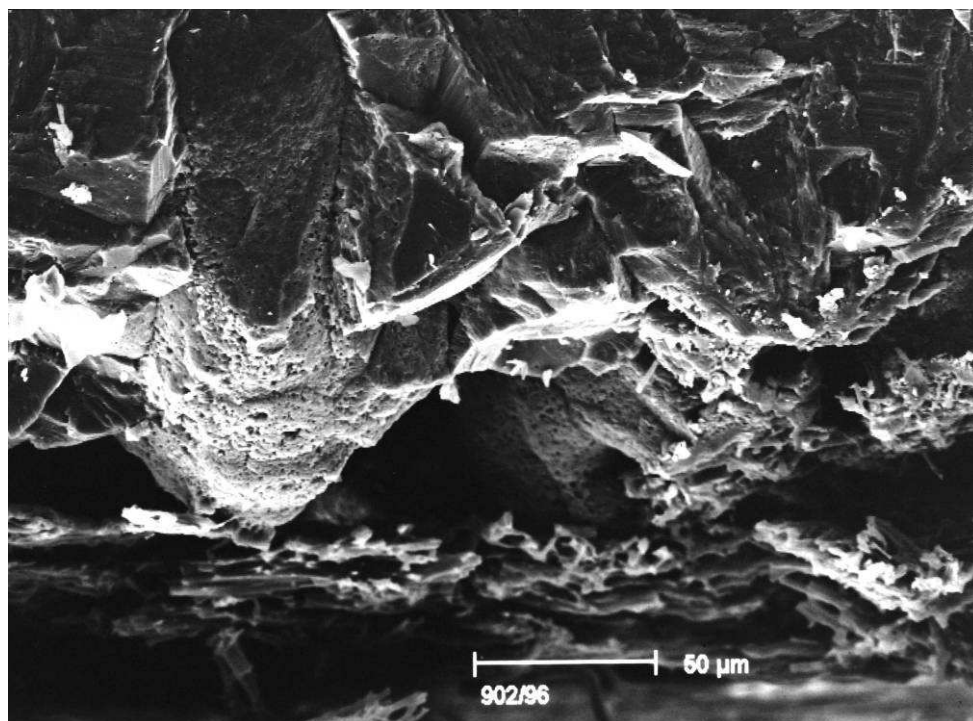


Imagen 5.10.: Capa mamilar de la cáscara del huevo depositado en el MHNB colectado en 1.907 en la que se aprecia la estructura de los conos basales.

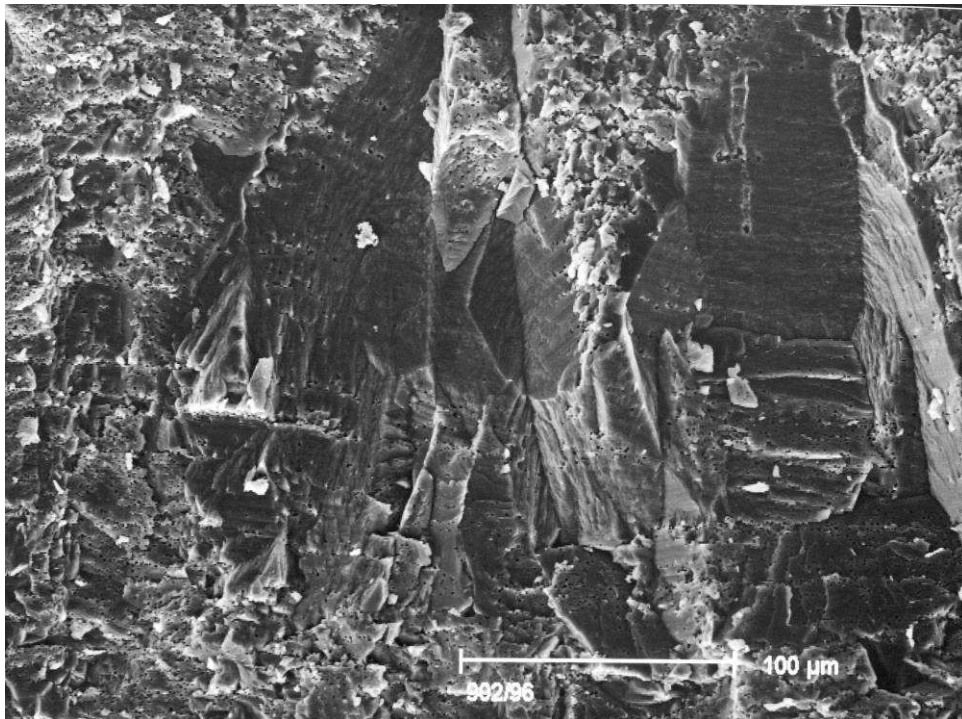


Imagen 5.11.: *Capa palizada de la cáscara del huevo depositado en el MHNB colectado en 1.907 con los microporos y la estructura cristalina típica.*

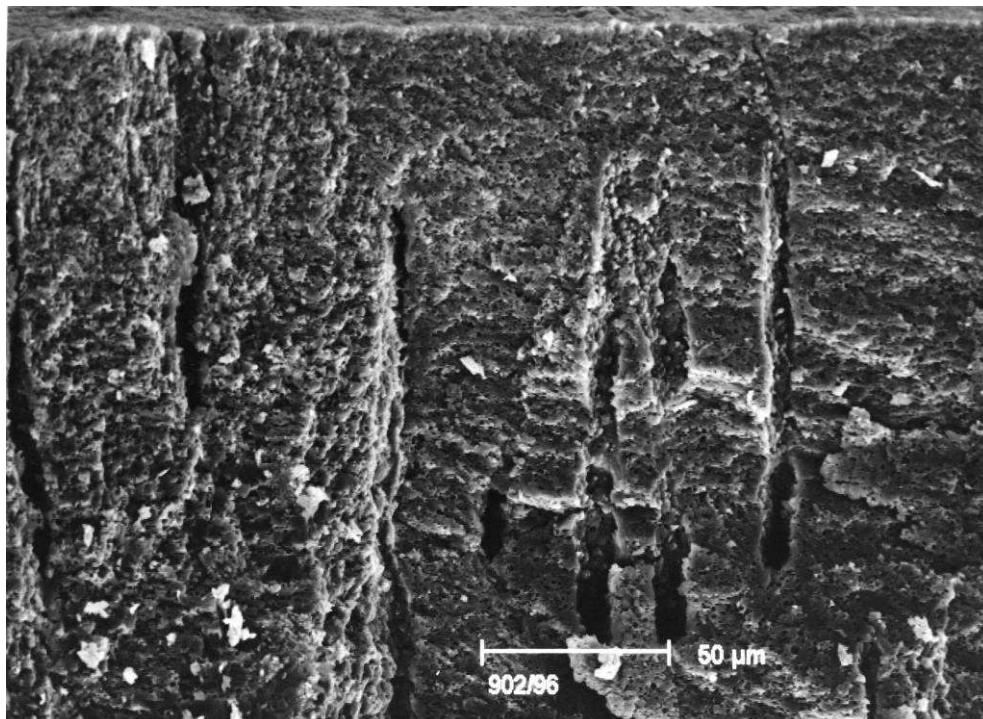


Imagen 5.12.: *Capa reticular de la cáscara del huevo depositado en el MHNB colectado en 1.907 que permite ver los mesoporos que se abren al exterior y el sistema reticular de poros.*

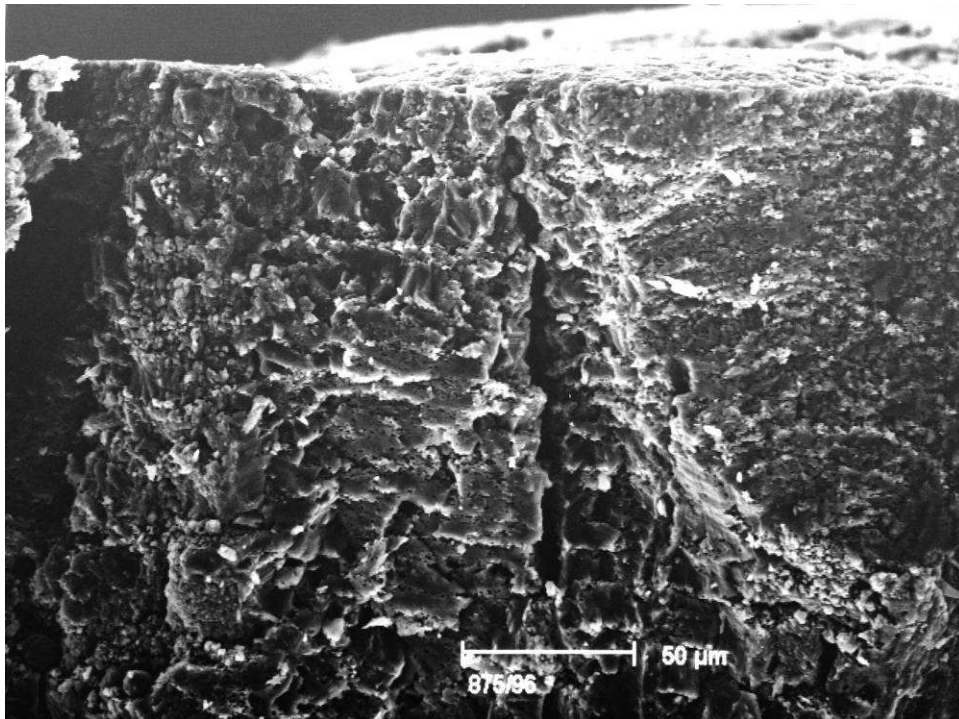


Imagen 5.13.: *Capa reticular de la cáscara del huevo depositado en el MHNG colectado en 1.868 que permite ver los meso y microporos y la estructura esponjosa.*

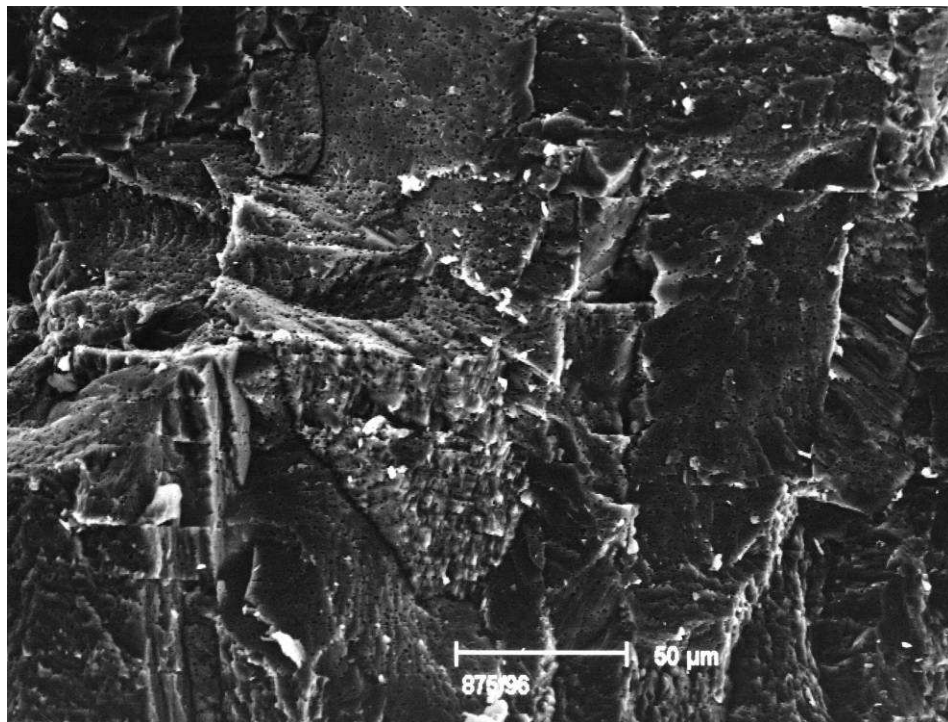


Imagen 5.14.: *Detalle de la transición entre las capas palizada y mamilar de la cáscara del huevo depositado en el MHNG colectado en 1.868.*

5.1.3. Morfometría ultraestructural de los huevos antiguos

Los resultados de la morfometría de las diferentes capas e índices determinados mediante microscopía electrónica de barrido (morfometría ultraestructural) de las 8 cáscaras de museo estudiadas, queda reflejada en la Tabla 5.2.

	X ± SD	Min	Max
Espesor	573.5 ± 121.8	391.6	714.0
C. Mamilar	105.1 ± 24.3	136.9	70.4
C. Palizada	344.5 ± 76.3	235.0	445.0
C. Reticular	129.7 ± 37.4	74.0	177.0
Diámetro Conos	93.0 ± 36.6	60.5	141.7
I. Ratcliffe	3.614 ± 0.441	3.023	4.078
I. Cooke	0.4109 ± 0.07	0.2501	0.4582

Tabla 5.2: Morfometría ultraestructural de los 8 huevos antiguos de Quebrantahuesos depositados en museos.

La capa de mayor espesor es la capa palizada, que representa el 60 % del espesor total de la cáscara. Se ha encontrado una amplia variación en el espesor de la cáscara y en los índices. El espesor medio de la cáscara ha sido de 573.5 μ . Sin embargo, la variación en las 8 cáscaras estudiadas ha sido mas amplia de lo esperado, entre 391 y 714 μ .

En 6 de las 8 cáscaras en las que se pudo examinar los conos basales en la cara interna de la cáscara, se comprobó la ausencia de desgaste, indicando que el huevo había sido colectado al principio de la incubación o era infértil. En el caso de las puestas recogidas en enero y febrero es mas posible que la ausencia de desgaste se debiera a que habían sido colectados al principio de la incubación. Sin embargo hay huevos que se colectaron muy tardíos (finales de marzo) y uno de ellos ha sido, precisamente, uno de los dos que no hemos podido examinar los conos basales ya que la delicada estructura de la cáscara no permitió la digestión con NaOH de las membranas. Sin embargo, el otro huevo examinado, colectado a finales de marzo, no presentaba desgaste en los conos basales, por lo que probablemente era infértil (Imagen 5.7).

Se ha podido analizar la superficie de la cáscara de uno de los huevos, en los que se podía apreciar todavía la capa de barro que se observa en los huevos actuales. El análisis semicuantitativo reveló la presencia de cantidades de Fe similares a las de los huevos actuales así como la presencia de silicatos de Mg y Al (arcillas y feldespatos) también muy similares a los huevos actuales (Imagen 5.6).

5.2. Estudio de los huevos actuales

5.2.1. Residuos de pesticidas organoclorados y PCBs

Los niveles medios de pesticidas organoclorados y PCBs se expresan en la Tabla 5.3. El único pesticida organoclorado que se ha detectado en el 100 % de las muestras analizadas ($n = 20$) ha sido el p,p' -DDE. El isómero p,p' -DDT se ha detectado en un 90 % de las muestras ($n = 18$), el lindano (isómero γ del hexaclorociclohexano (HCH) y el heptacloro en un 80 % de las muestras ($n = 16$) y el heptacloro epóxido en un 60 % de las muestras analizadas ($n = 12$). El resto de pesticidas analizados se detectó en menos del 35 % de las muestras analizadas. No se ha detectado en ninguna de las muestras el isómero δ del HCH, ni el α del clordano, ni el β del clordano ni mirex ni oxiclordano.

Analito	Frec.	G \pm SD	Min	Max
α HCH	7	0.003 \pm 0.052	ND	0.140
β HCH	6	0.013 \pm 0.414	ND	0.940
Lindano (γ HCH)	16	0.007 \pm 0.066	ND	0.210
Heptacloro	16	0.040 \pm 0.182	ND	0.771
Heptacloro Epóxido	12	0.029 \pm 0.280	ND	0.995
Aldrin	6	0.005 \pm 0.206	ND	0.510
Dieldrin	7	0.001 \pm 0.152	ND	0.410
p,p' DDE	20	0.192 \pm 0.525	0.013	2.200
p,p' DDD	7	0.005 \pm 0.014	ND	0.032
p,p' DDT	18	0.095 \pm 0.174	ND	0.590
Alaclor	3	0.003 \pm 0.019	ND	0.033
Hexaclorobenceno	6	0.024 \pm 0.370	ND	0.930
PCB's Totales	20	0.374 \pm 0.655	0.025	1.258

Tabla 5.3: Media geométrica y SD y frecuencia de los diferentes pesticidas organoclorados analizados en los huevos de Quebrantahuesos ($n = 20$).

Fertilidad	n	G \pm SD
Fértil	16	0.155 \pm 0.545
Infértil	4	0.311 \pm 0.385

Tabla 5.4: Media geométrica y SD del DDE en función de la fertilidad.

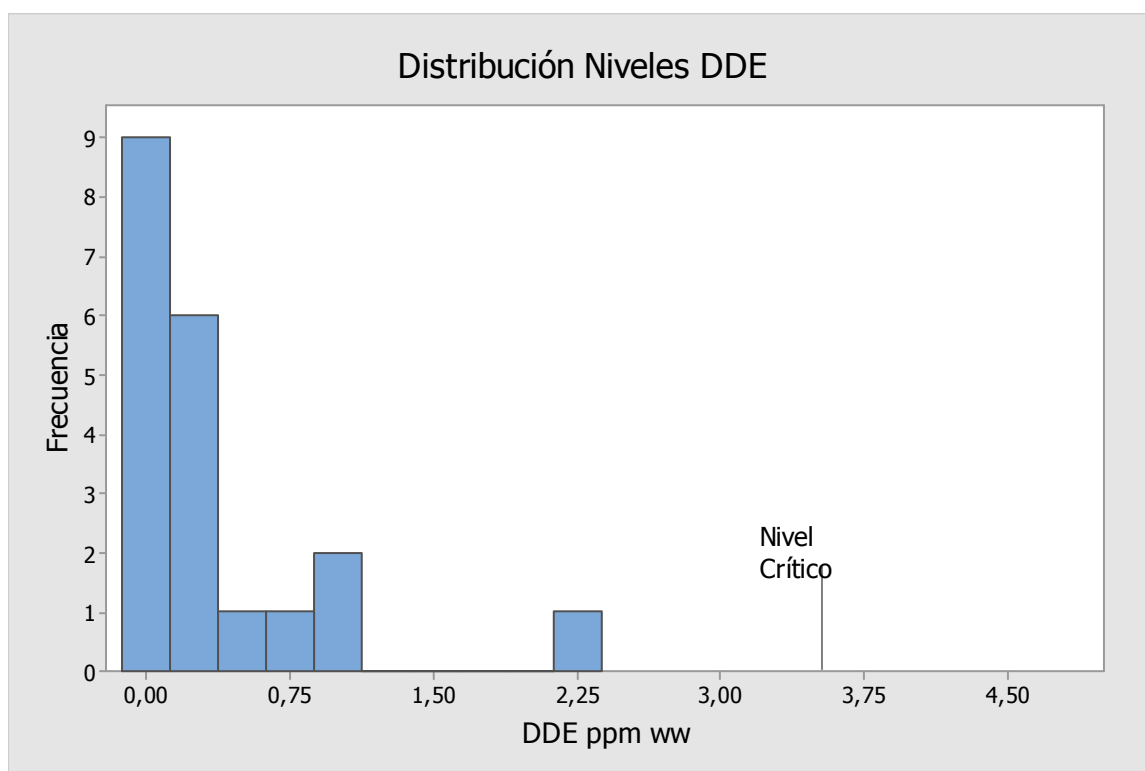


Figura 5.1: Histograma de las frecuencias de los niveles de DDE en la muestra estudiada ($n = 20$), con indicación del nivel crítico establecido en la mayoría de las Falconiformes.

El histograma de las frecuencias de los niveles de DDE se muestra en la Figura 5.1., con indicación del nivel crítico para este pesticida que se ha descrito en la mayoría de las Falconiformes.

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de DDE entre huevos fértiles e infértiles (One way ANOVA, $g/ = 19$, $F = 0,56$, $p = 0.464$) a pesar de que los huevos infértiles presentaron mayores valores (Tabla 5.2), posiblemente debido a que entre la muestra solo se analizaron 4 huevos infértiles.

Los niveles de DDE y la carga total de OC muestra una tendencia alcista en los años 2000, con una tendencia a incrementarse de forma significativa a partir de 2005 (Figuras 5.2 y 5.3).

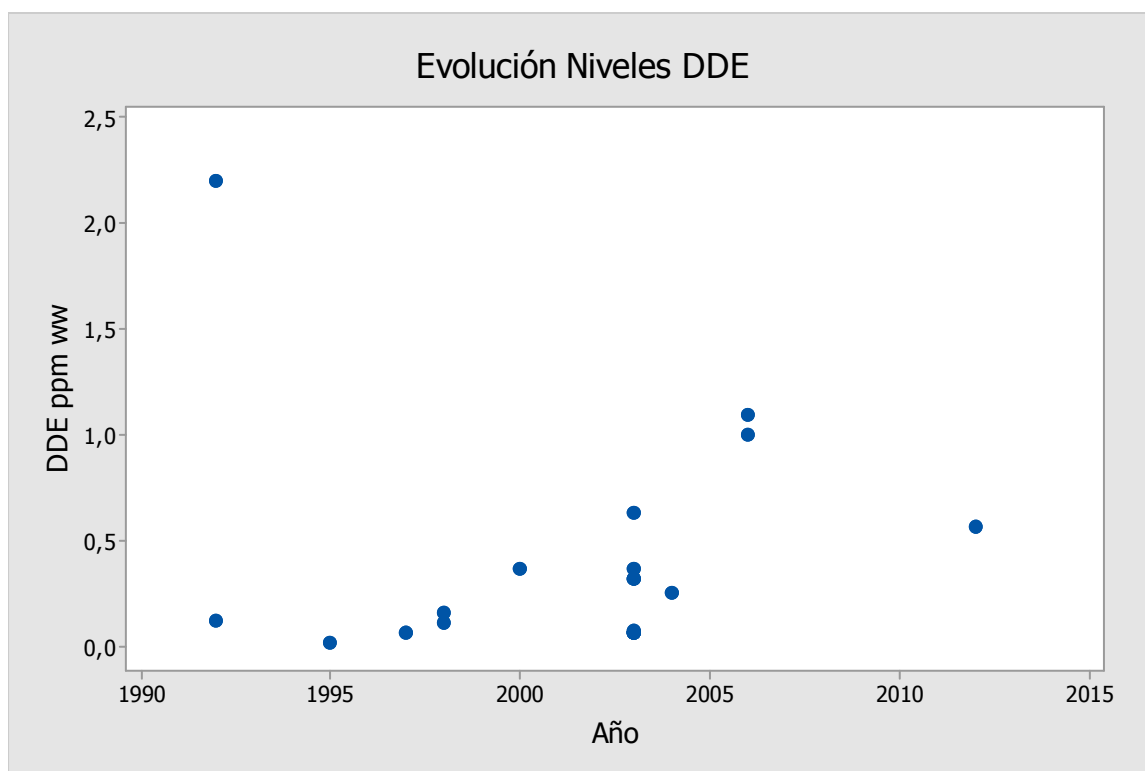


Figura 5.2: Evolución temporal de los niveles de DDE en el contenido de los huevos ($n = 20$) en el periodo de estudio.

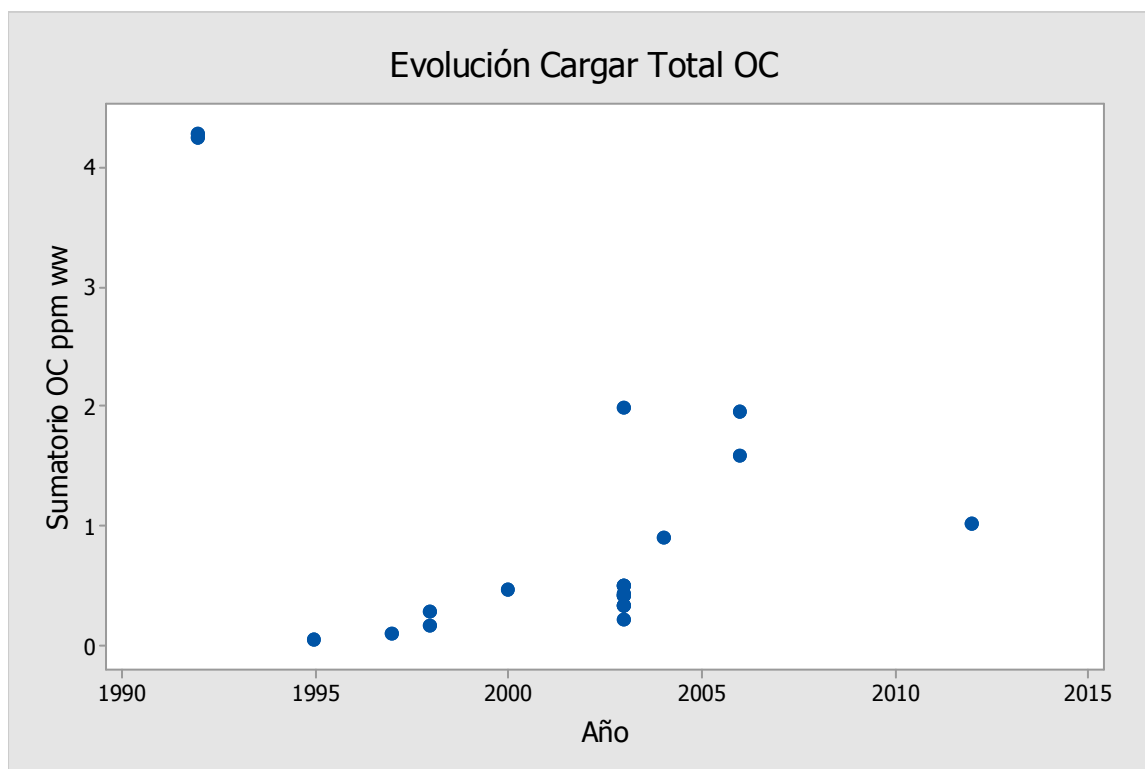


Figura 5.3: Evolución temporal de la carga total de organoclorados en el contenido de los huevos ($n = 20$) en el periodo de estudio.

5.2.2. Biometría de los huevos actuales.

Los resultados de la biometría de los huevos actuales ($n = 27$) se recoge en la Tabla 5.5. Los huevos actuales miden una media de 85.1 ± 3.5 mm (rango 80.6-94.3) de largo y 65.7 ± 3.3 (rango 65.8-71.9).

Parámetro	n	$X \pm SD$	Min	Max
Longitud	27	85.1 ± 3.5	80.6	94.3
Anchura	27	65.7 ± 3.3	58.6	71.9
Peso Fresco	27	203.4 ± 25.1	156.6	266.9
Superficie cáscara	27	$1,877.3 \pm 182.1$	1,483.2	2,300.2
Nº Total de Poros	27	$15,789 \pm 27,856$	103,522	213,889
Volumen	27	$188,694 \pm 24,378$	146,457	249,597
Volumen cáscara	27	$4,467.0 \pm 725.7$	2,718.0	5,684.9
Volumen contenido	27	$184,436 \pm 23,913$	142,660	245,176

Tabla 5.5: Valores medios e intervalos de variación de los parámetros biométricos de los huevos de Quebrantahuesos ($n = 27$) colectados en la actualidad.

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la biometría de los huevos actuales comparados con los de museo. Así, los huevos actuales tienen significativamente mayor longitud que los de museo (Tablas 5.6 y 5.7, One way ANOVA, $g/ = 89$, $F = 4.71$, $p = 0.033$), aunque no hay diferencias estadísticamente significativas en la anchura o en el peso fresco ($p = 0.973$ y $p = 0.391$).

Museo	n	$X \pm SD$	Min	Max
Longitud (mm)	63	83.09 ± 4.14	72.5	96.4
Anchura (mm)	63	65.70 ± 2.45	60.7	72.4
Peso fresco (gr)	63	197.12 ± 23.23	161.5	276.6

Tabla 5.6: Valores medios e intervalos de variación de los parámetros biométricos de los huevos de museo.

Actuales	n	$X \pm SD$	Min	Max
Longitud (mm)	27	85.07 ± 3.49	80.6	94.3
Anchura (mm)	27	65.68 ± 3.32	58.6	71.9
Peso fresco (gr)	27	201.88 ± 25.84	156.58	266.85

Tabla 5.7: Niveles medios e intervalos de variación de los parámetros biométricos de los huevos actuales.

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la biometría de los huevos fértiles comparados con los infértiles. Así, los huevos fértiles tienen significativamente mayor longitud que los infértiles (Tabla 5.6, One way ANOVA, $g/ = 89$, $F = 4.71$, $p = 0.033$), aunque no hay diferencias estadísticamente significativas en la anchura o en el peso fresco ($p = 0.973$ y $p = 0.391$) ni en la superficie de la cáscara, número total de poros, volumen, volumen de la cáscara o volumen del contenido.

Parámetro	n	$\bar{X} \pm SD$	Min	Max
Longitud (mm)	18	85.7 ± 4.0	80.6	94.3
Anchura (mm)	18	66.8 ± 2.5	62.1	71.9
Peso fresco (gr)	18	209.8 ± 23.7	176.1	266.9

Tabla 5.8: Valores medios e intervalos de variación de los parámetros biométricos de los huevos fértiles.

Parámetro	n	$\bar{X} \pm SD$	Min	Max
Longitud (mm)	9	83.8 ± 1.8	81.2	86.2
Anchura (mm)	9	63.5 ± 3.9	58.6	71.1
Peso fresco (gr)	9	188.9 ± 23.3	156.6	235.5

Tabla 5.9: Niveles medios e intervalos de variación de los parámetros biométricos de los huevos infértiles.

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los huevos primeros, segundos y únicos en ninguno de los parámetros biométricos. Sin embargo, si se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en casi todos los parámetros biométricos entre poblaciones (Tabla 5.10): longitud (ANOVA, $df = 2$, $F = 8.20$, $p = 0.002$), anchura (ANOVA, $df = 2$, $F = 4.98$, $p = 0.016$), peso fresco (ANOVA, $df = 2$, $F = 8.18$, $p = 0.002$), superficie de la cáscara (ANOVA, $df = 2$, $F = 6.99$, $p = 0.004$), volumen (ANOVA, $df = 2$, $F = 8.17$, $p = 0.002$), volumen del contenido (ANOVA, $df = 2$, $F = 8.27$, $p = 0.002$), pero no en el volumen de la cáscara (ANOVA, $df = 2$, $F = 0.52$, $p = 0.016$).

Los huevos del Pirineo Axial tienen significativamente menor tamaño, peso fresco y volumen que los huevos de la Sierras Exteriores Aragonesas y del Prepirineo de Lleida (Tabla 5.10) y no existen, sin embargo, diferencias estadísticamente significativas en las otras dos poblaciones entre si.

Finalmente, las diferencias entre los diferentes periodos indican que en el periodo 2006-2012 hay una reducción estadísticamente significativa de la superficie de la cáscara (ANOVA, $df = 3$, $F = 3.47$, $p = 0.034$) y en el número total de poros (ANOVA, $df = 3$, $F = 5.23$, $p = 0.014$), y en los periodos 2001-2006 y 2006-2012 en el volumen de la cáscara (ANOVA, $df = 3$, $F = 5.36$, $p = 0.006$).

P. Axial	<i>n</i>	<i>X</i> ± <i>SD</i>	Min	Max
Longitud (mm)	8	84.1 ± 2.4	80.8	87.9
Anchura (mm)	8	64.2 ± 3.5	58.6	68.9
Peso fresco (gr)	8	189.8 ± 19.3	156.6	211.8
Sierras Aragón	<i>n</i>	<i>X</i> ± <i>SD</i>	Min	Max
Longitud (mm)	7	88.8 ± 3.9	83.7	94.3
Anchura (mm)	7	68.5 ± 2.3	65.7	71.9
Peso fresco (gr)	7	229.1 ± 24.7	199.8	266.9
Prepirineo Lleida	<i>n</i>	<i>X</i> ± <i>SD</i>	Min	Max
Longitud (mm)	11	83.6 ± 2.3	80.6	87.7
Anchura (mm)	11	65.6 ± 2.3	63.1	71.1
Peso fresco (gr)	11	197.0 ± 17.2	177.0	235.5

Tabla 5.10: Valores medios e intervalos de variación de los parámetros biométricos de los huevos en las diferentes poblaciones.

5.2.3. Ultraestructura de los huevos actuales.

La ultraestructura de la cáscara de los huevos actuales no difiere morfológicamente de la encontrada en los huevos antiguos de museo. La porción calcificada de la cáscara en los huevos actuales es también trilaminar y reticular (Board, 1982), con los macroporos tubulares simples (Tyler, 1969; Bland, 1992). En ninguna de las cáscaras examinadas ($n = 63$) se ha encontrado la capa cristalina superficial (Board, 1982). En la superficie externa de todas las cáscaras se apreció la presencia de cutícula externa y en varias de ellas se detectó también la presencia de arcillas y feldespatos impregnándolas en cantidades variables.

El espesor medio de la capa de arcillas que impregnaba la cáscara tenía un grosor medio de 6.2 μ y estaba compuesta mayoritariamente de Fe, Si y Al, con cantidades menores de Mg y presencia de S, Cl, Na, P y K, que se corresponde con los elementos característicos de las arcillas y feldespatos (silicatos de Al y Mg). La composición semicuantitativa de la impregnación de las plumas coincide plenamente con la composición de la impregnación de los huevos.

En algunas cáscaras se detectó la presencia de los conos basales de tipo "B" que describe Solomon (1997), así como concreciones o incrustaciones de carbonato cálcico no cristalino (Solomon, 1997; Bland, 1992) y esferulitas cubriendo la cutícula externa (Garret, 1973).

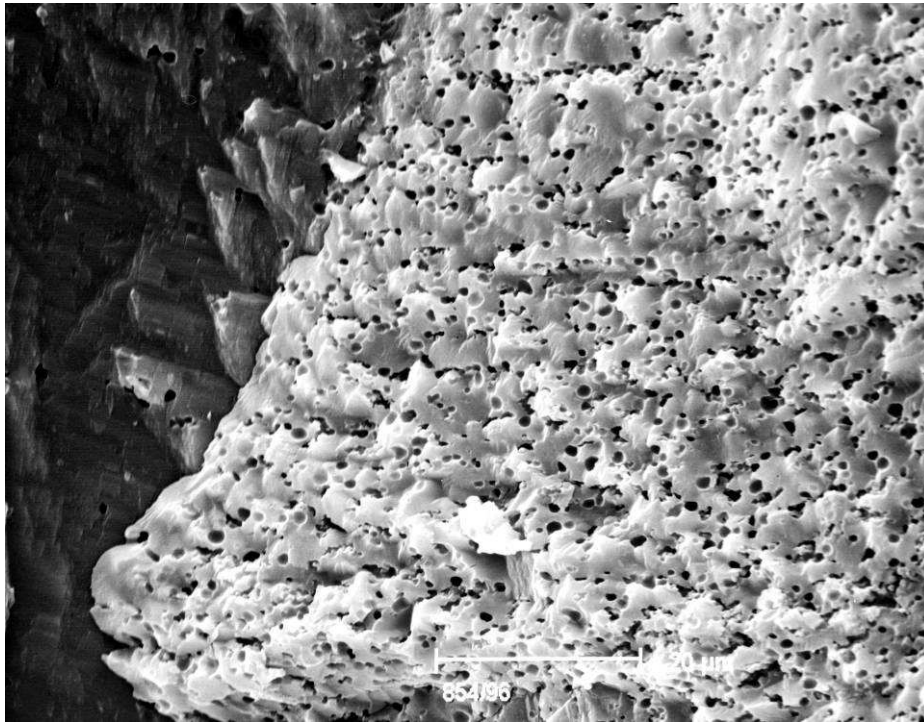


Imagen 5.15.: Detalle de la estructura esponjosa de la capa reticular en un corte oblicuo de la cáscara de un huevo de Huesca (1996) en el que se observa la red de meso y microporos y la transición hacia la capa palizada.

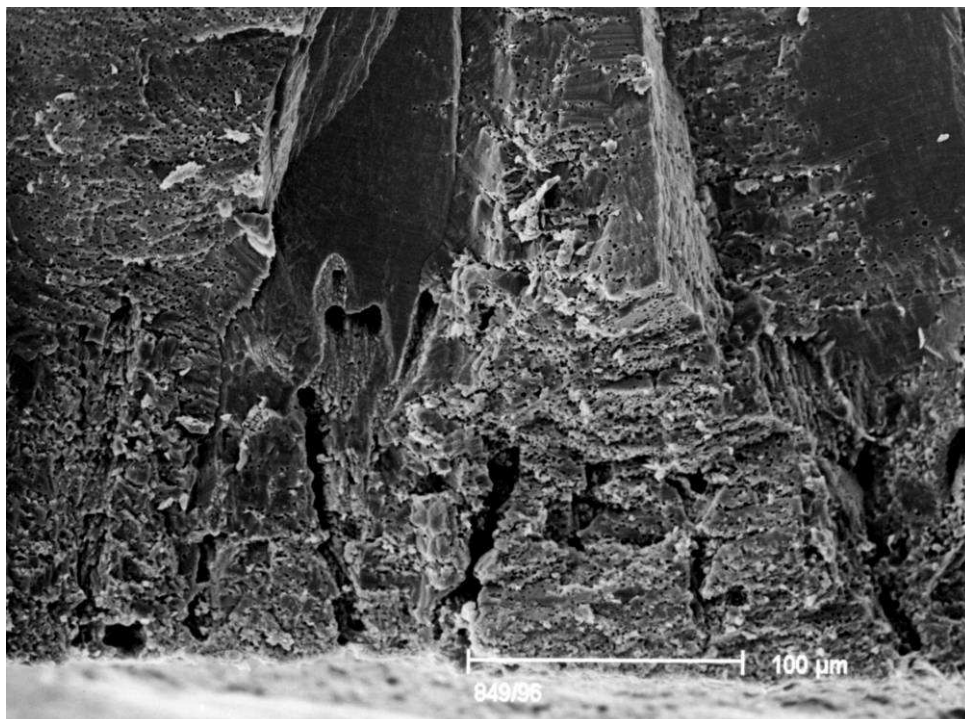


Imagen 5.16.: Detalle de la capa reticular de la cáscara de un huevo de Huesca (1996) y la forma irregular del límite con al capa palizada.

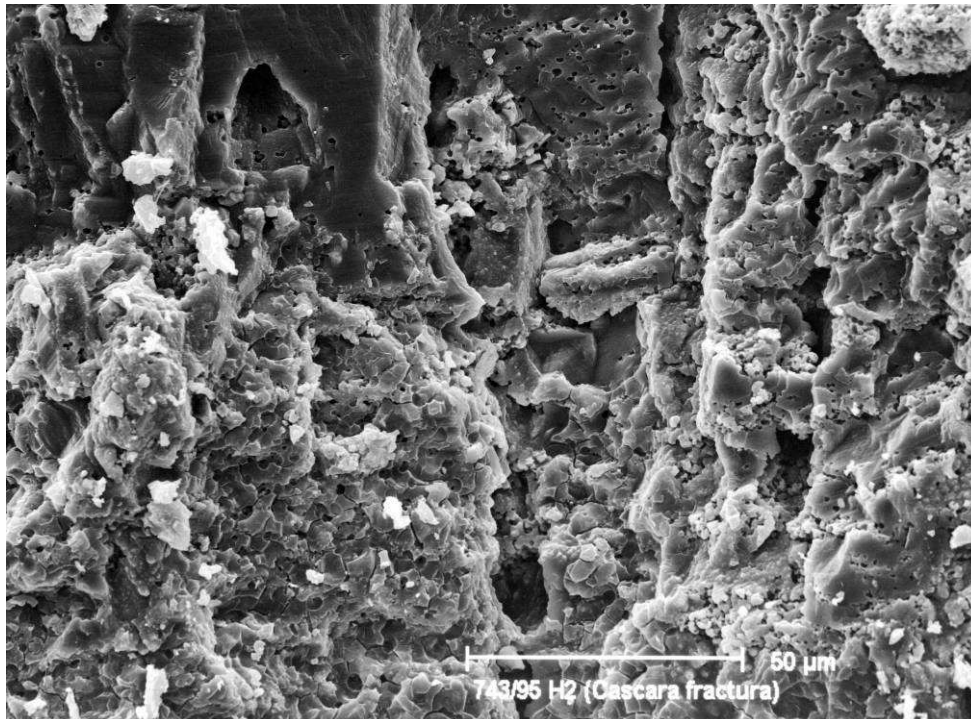


Imagen 5.17.: Detalle de la capa reticular de la cáscara de un huevo de Huesca (1995) y parte de la capa palizada.

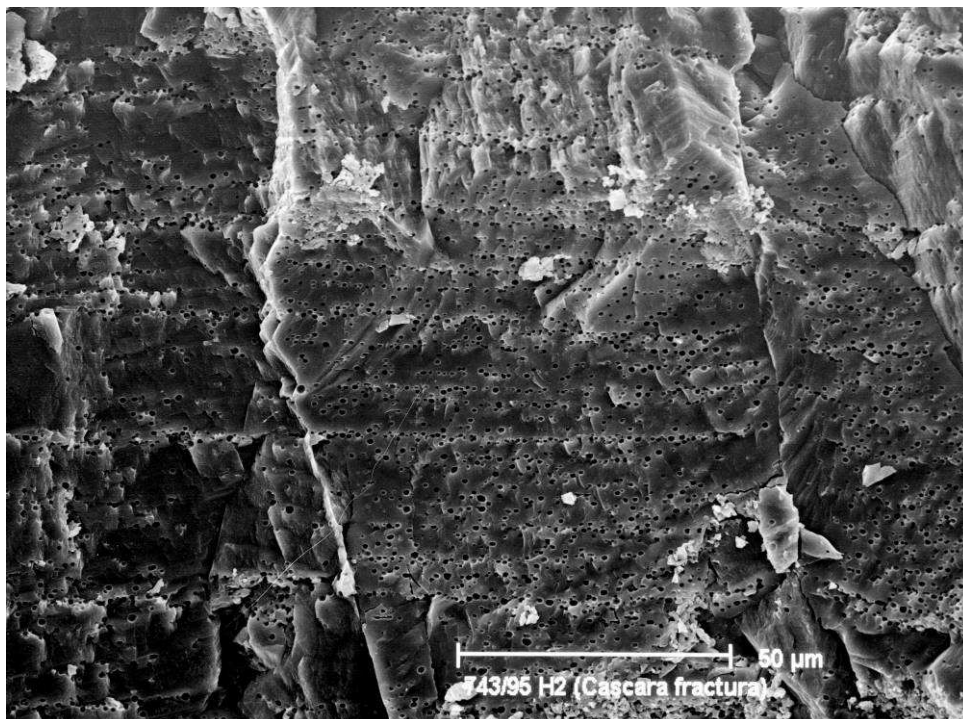


Imagen 5.18.: Detalle de la capa palizada de la cáscara de un huevo de Huesca (1995) en la que se observa la presencia de múltiples microporos.



Imagen 5.19.: Detalle de la ultraestructura de la capa mamilar de la cáscara de un huevo de Huesca (1995).

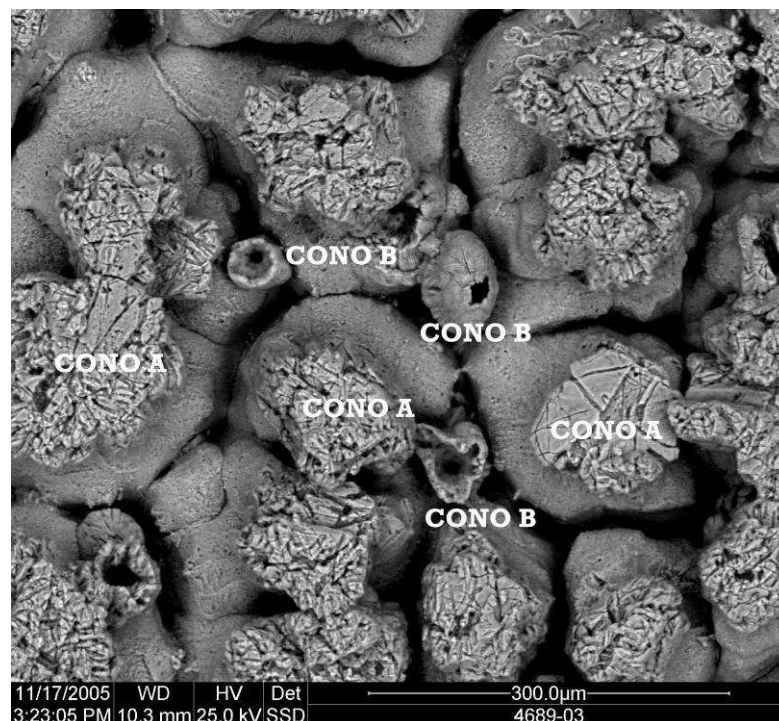


Imagen 5.20.: Detalle de la cara interna de la cáscara de un huevo de la provincia de Lleida (2003) en la que se aprecia la presencia de conos tipo "B" descritos por Solomon (1997).

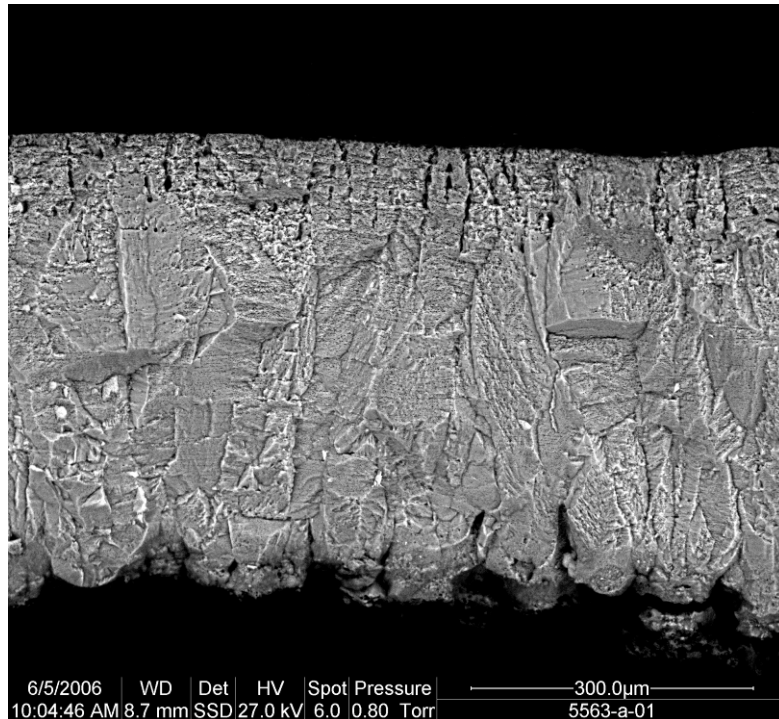


Imagen 5.21.: Corte transversal de la cáscara de un huevo sin desarrollo embrionario procedente de los Pirineos franceses (2006) mostrando la ultraestructura normal.

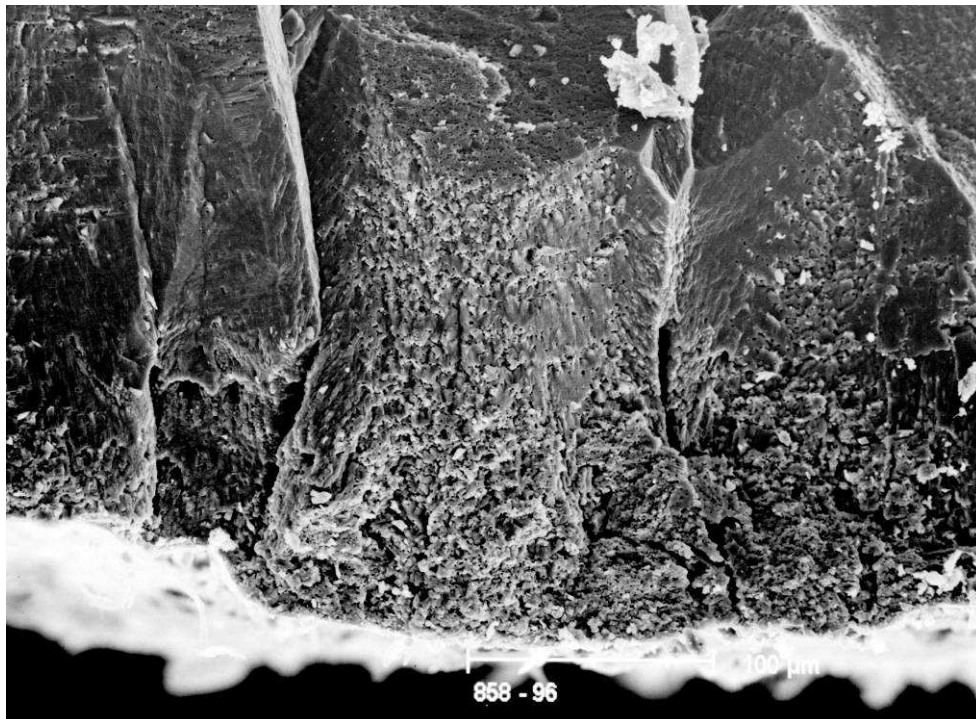


Imagen 5.22.: Corte transversal de la capa reticular a nivel del polo ancho de la cáscara de un huevo de Huesca (1990) en el que se aprecia la formación de un mamelón.

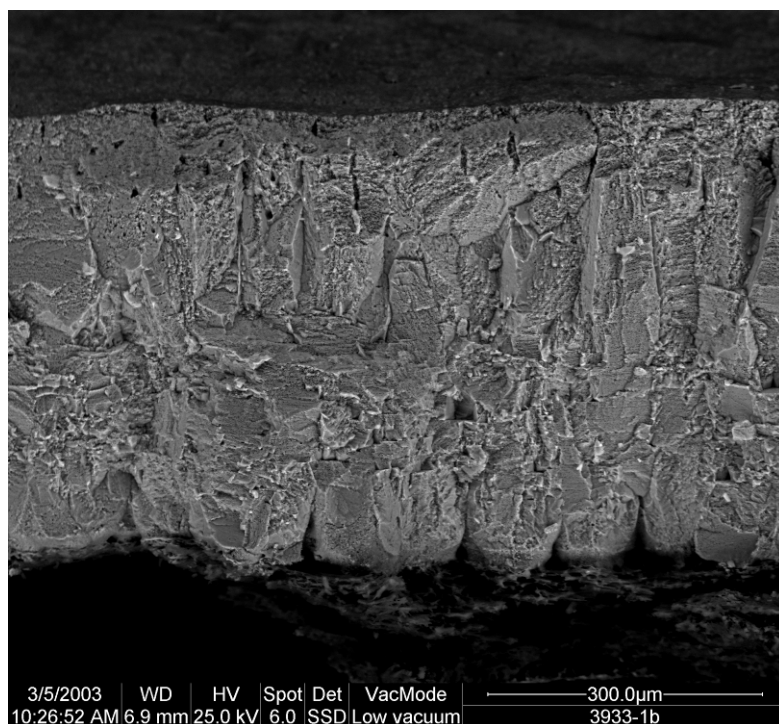


Imagen 5.23.: Corte transversal a nivel del polo ancho de la cáscara de un huevo de Huesca (2003).

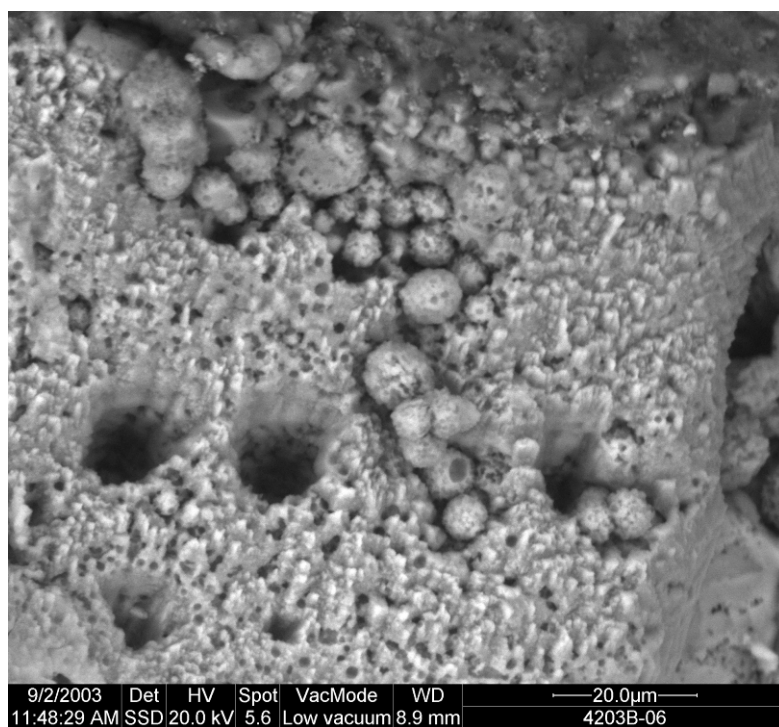


Imagen 5.24.: Detalle de las concreciones de carbonato cálcico no cristalino en la capa mamilar de un huevo de Lleida de 2003.

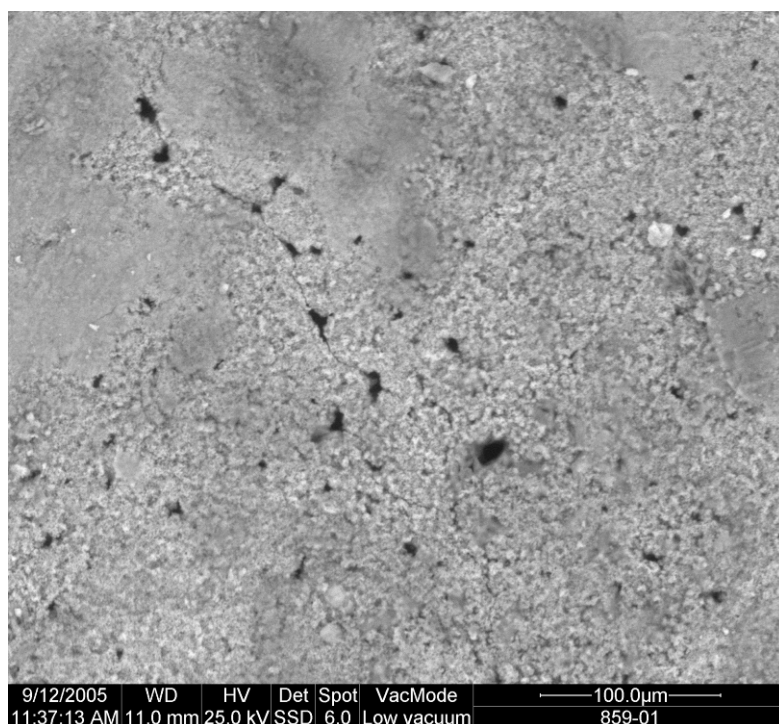


Imagen 5.25.: Detalle de la apertura de los macroporos en la superficie externa de la cáscara de un huevo de Quebrantahuesos de Lleida de 1995 tras la limpieza con NaOH.

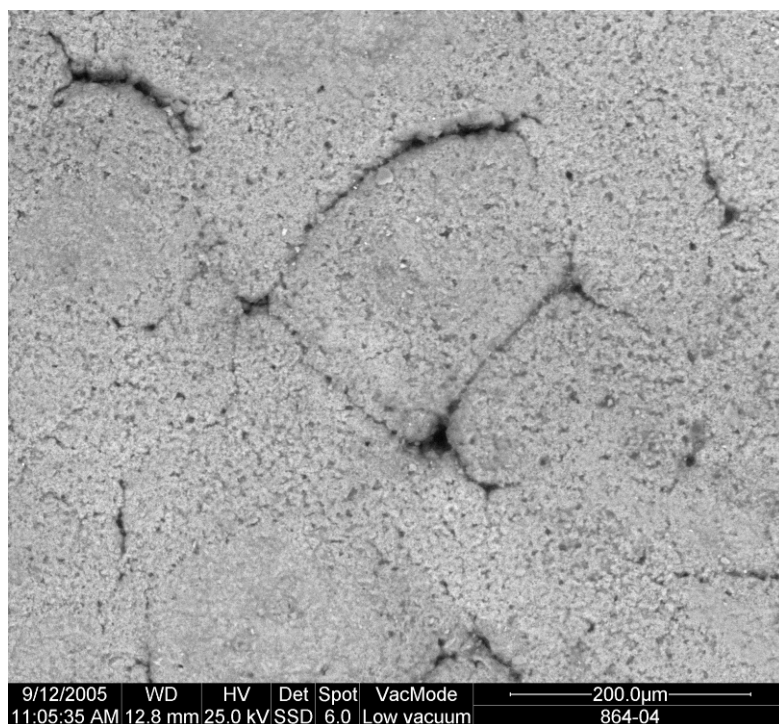


Imagen 5.26.: Detalle de los en la superficie externa a nivel del polo ancho de la cáscara de un huevo de Quebrantahuesos de Lleida de 1994, tras la limpieza con NaOH, en la que se aprecian los mamelones y los poros.

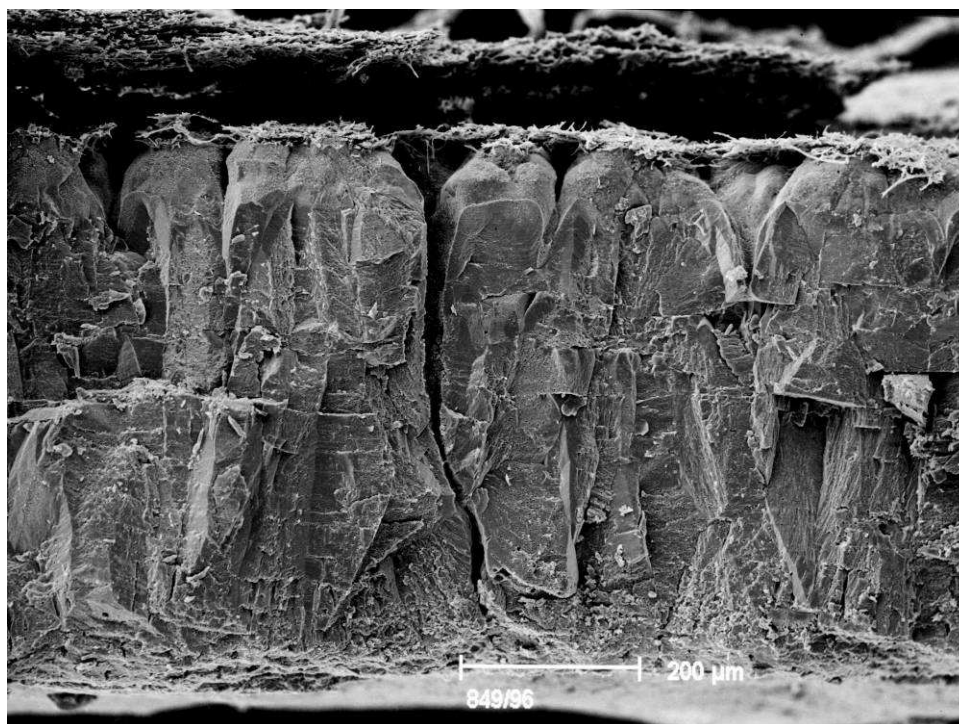


Imagen 5.27.: Corte transversal de la cáscara de un huevo de Huesca (1992) depositado en el Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid. La limpieza extrema de la cáscara erosionó la capa mamilar en algunas zonas. Se aprecia un macroporo en todo su recorrido

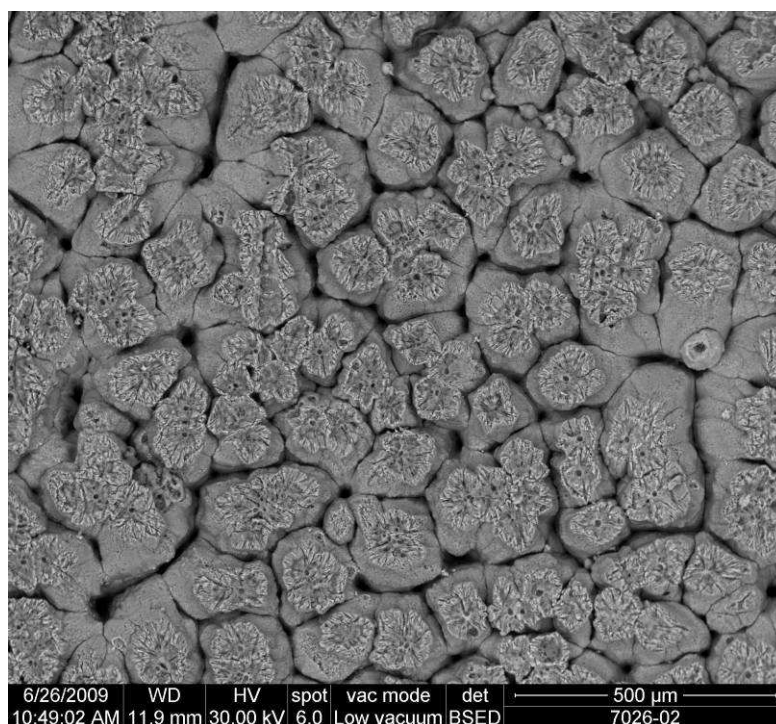


Imagen 5.28.: Detalle de la cara interna de la cáscara de un huevo de la provincia de Lleida (2002) en la que se aprecia la presencia de conos "B".

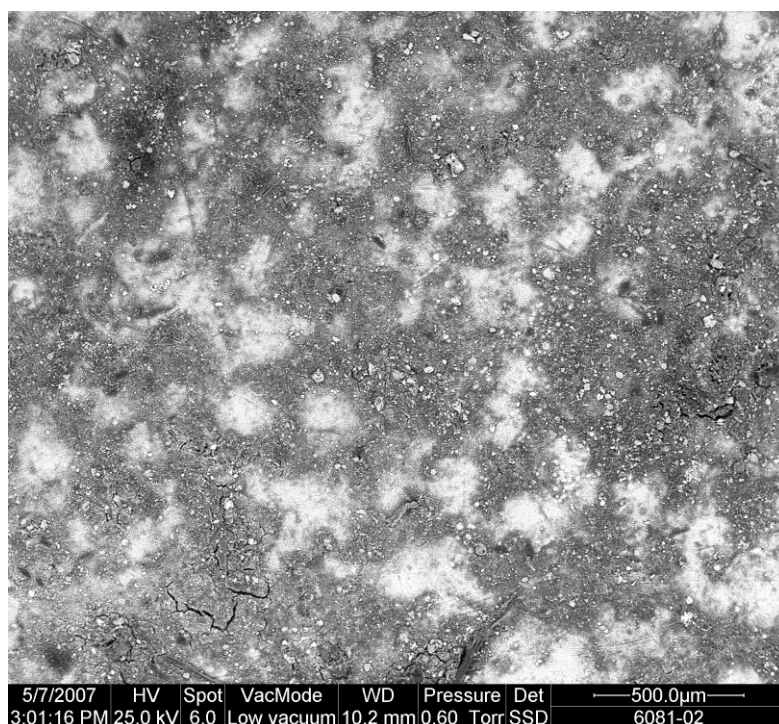


Imagen 5.29.: Detalle de la cara externa de la cáscara de un huevo de la provincia de Lleida (2002) en el que se aprecia la presencia de barro impregnándola.

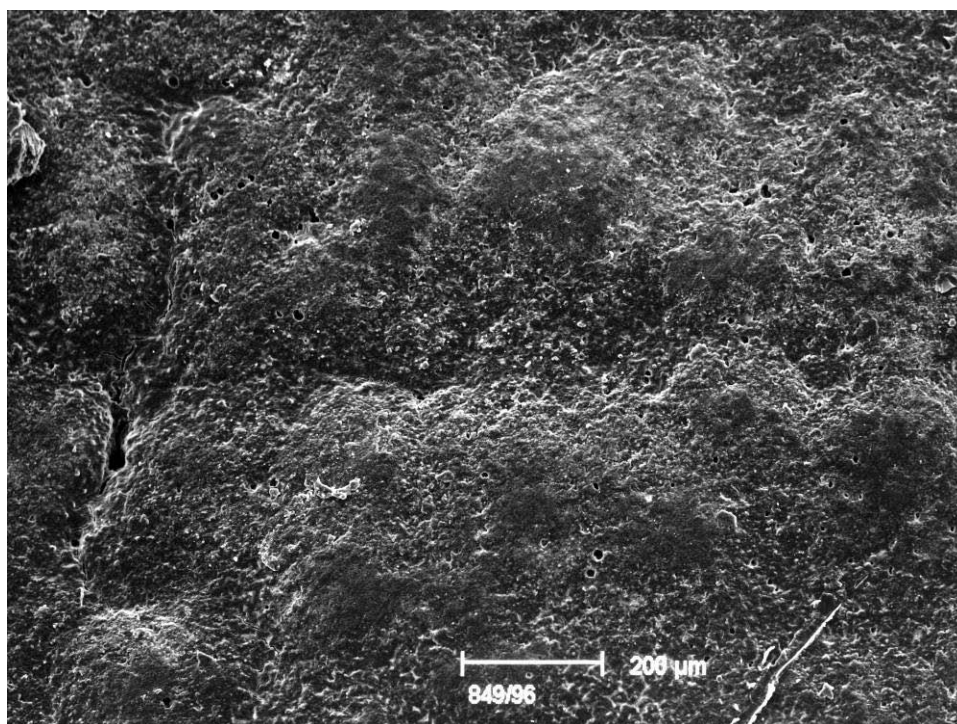


Imagen 5.30.: Detalle de la cara externa de la cáscara de un huevo de la provincia de Huesca (1992) con una impregnación extrema de barro.

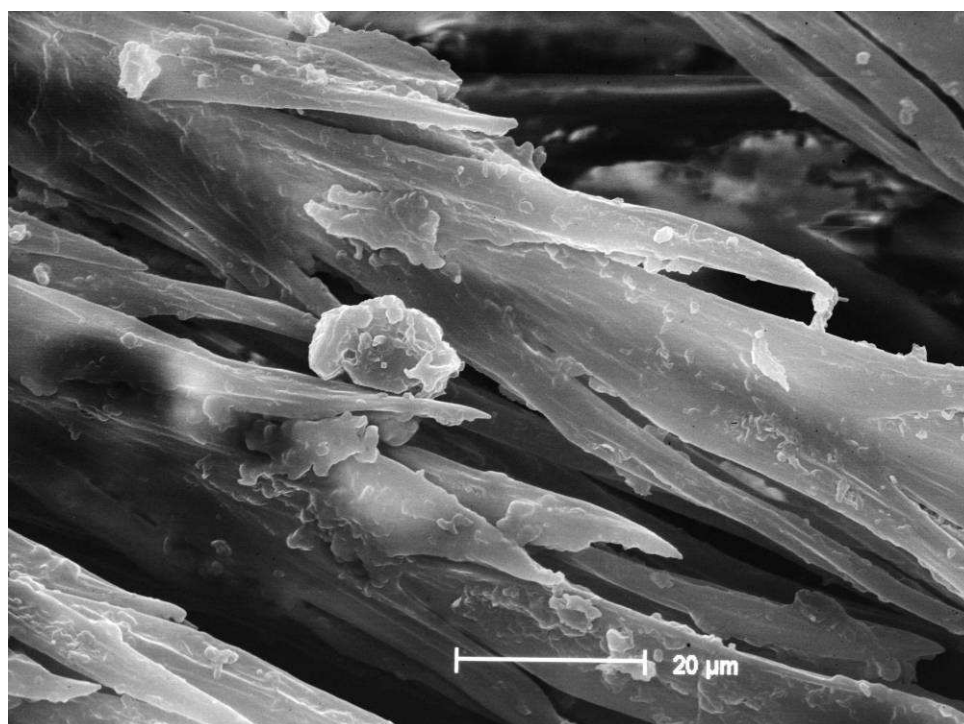


Imagen 5.31.: Detalle de la impregnación por arcillas de una pluma de adulto en el que se aprecia la formación de las estructuras descritas por Brown y Bruton, (1991).

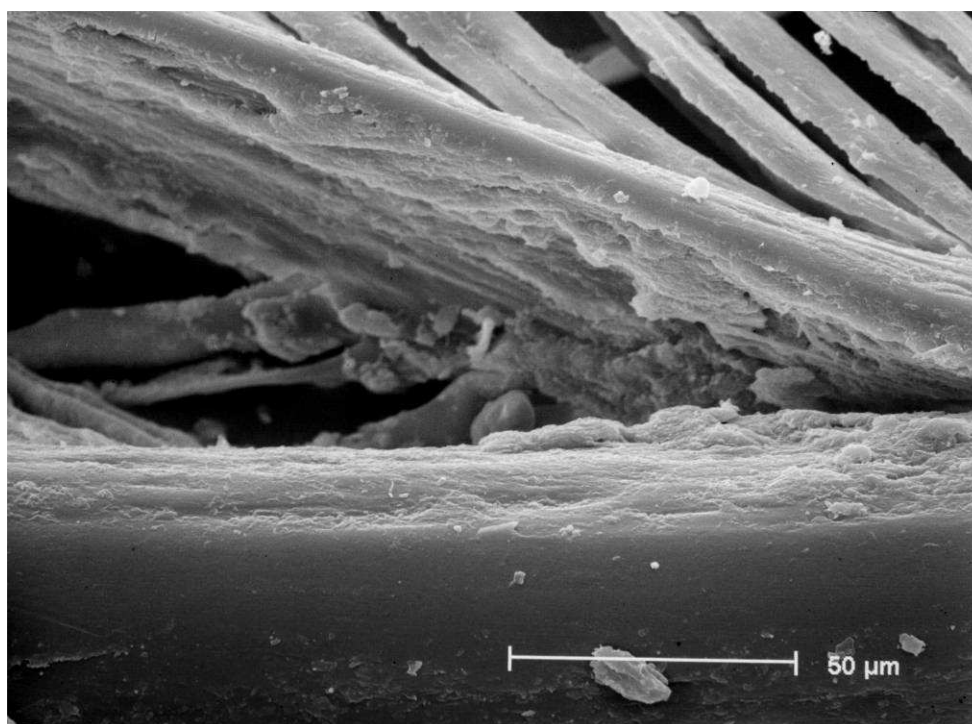


Imagen 5.32.: Detalle de la impregnación por arcillas de una pluma de adulto en el que se aprecia la presencia de impregnación por arcillas hasta las capas mas profundas.

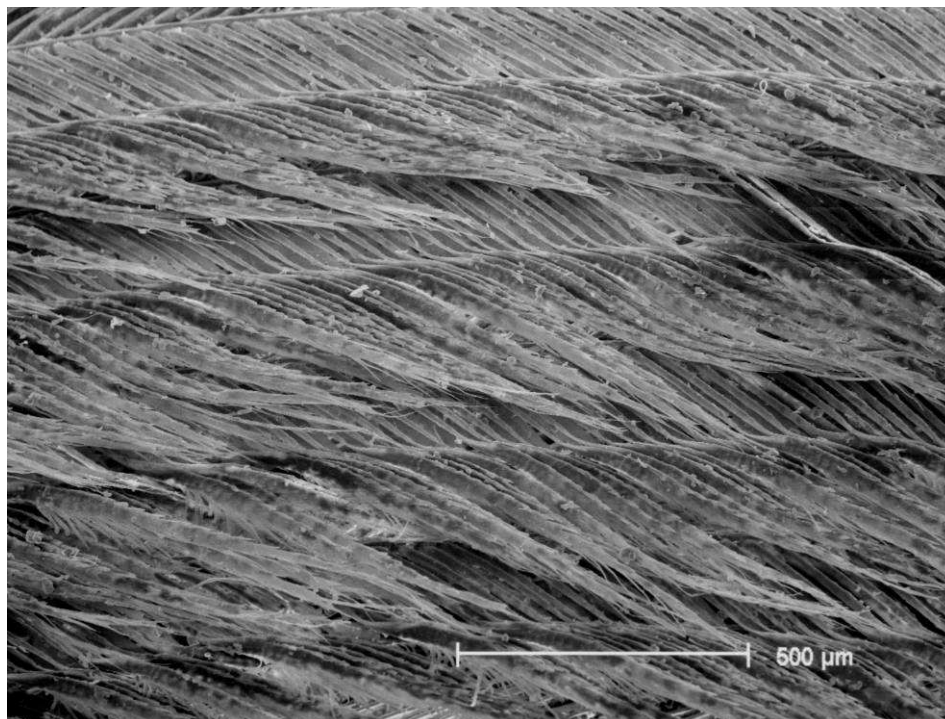


Imagen 5.33.: Detalle de la impregnación por arcillas de una pluma de subadulto en el que se aprecia la presencia de impregnación por arcillas

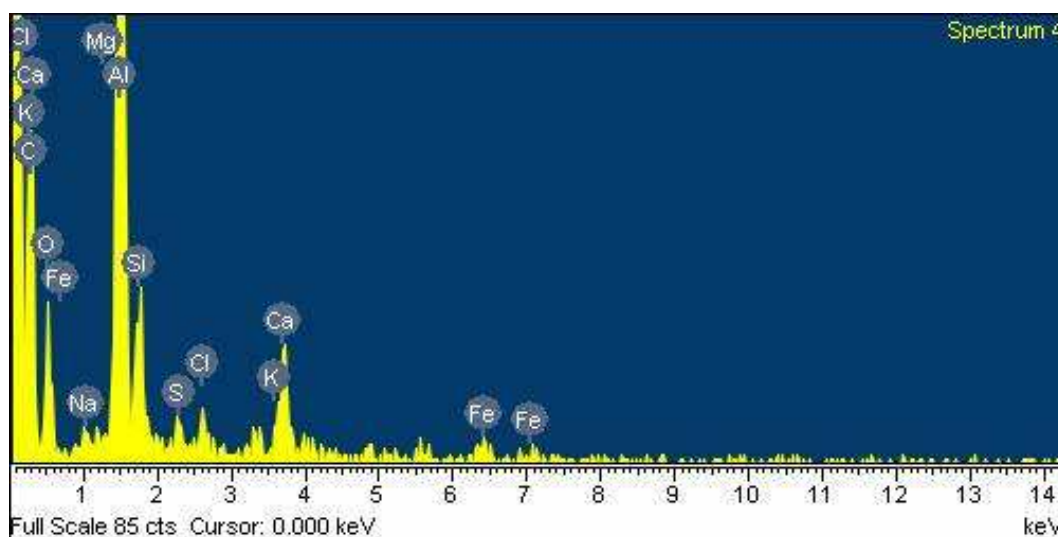


Imagen 5.34.: Espectro de composición de la impregnación por arcillas de la pluma de adulto de la Imagen 5.31.

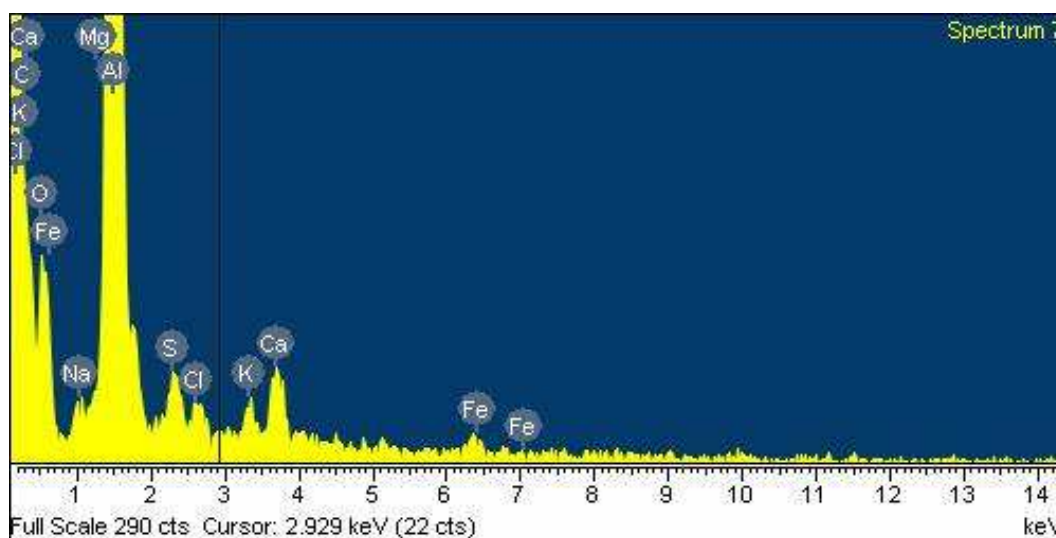


Imagen 5.35.: Espectro de composición de la impregnación por arcillas de la cáscara de la Imagen 5.30.

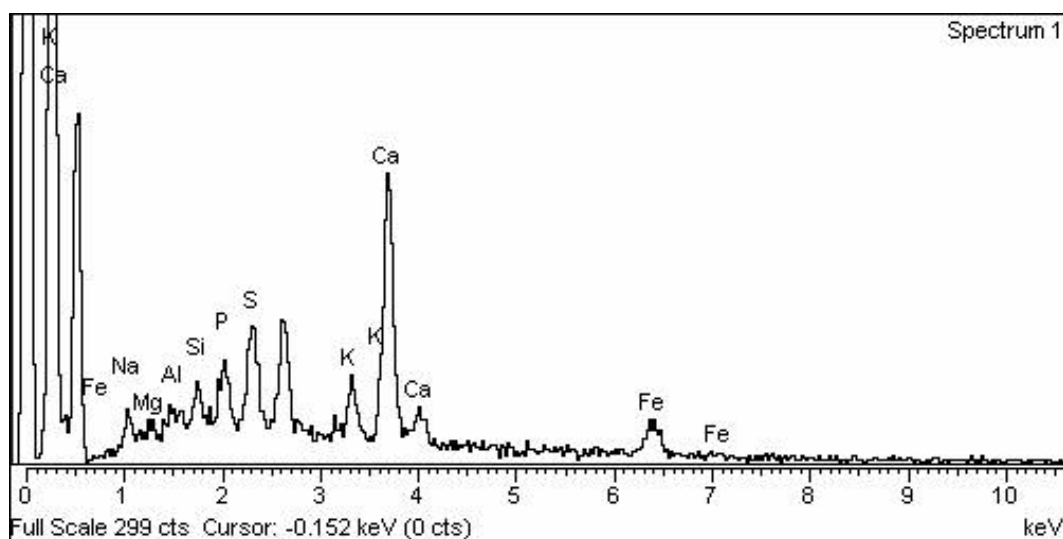


Imagen 5.36.: Espectro de composición de la impregnación por arcillas de la pluma de subadulto de la Imagen 5.33.

5.2.4. Fertilidad de los huevos actuales.

Del total de huevos analizados, un 66,67 % ($n = 58$) eran fértiles y un 35.56 % ($n = 27$) infértiles. Sin embargo, la fertilidad real puede ser mayor que la expresada ya que los primeros estadios del desarrollo embrionario no pueden detectarse cuando estudiamos la fertilidad a través del desgase de los conos basales. En realidad, ni siquiera cuando se realiza la necropsia del huevo conocemos de forma inequívoca la fertilidad de un huevo, por lo que empleamos el término "*sin desarrollo embrionario*" en vez de "*infértil*" cuando nos referimos a la fertilidad de un huevo. Por ello, no es posible referirse a la fertilidad global real en términos absolutos sin tener en cuenta estos sesgos.

Así, de los 27 huevos en los que no se detectó desarrollo embrionario, sólo se podrían considerar infértiles con cierta confianza 8 casos (8.89 % del total), estando el resto encuadrados bajo la categoría de "*sin desarrollo embrionario*" (26,67 %, $n = 24$).

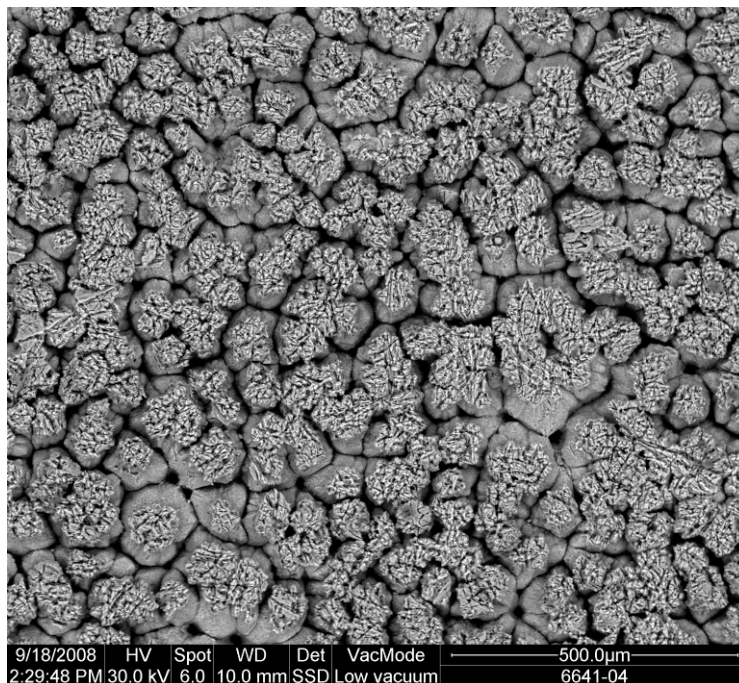


Imagen 5.37.: Detalle de la cara interna de la cáscara de un huevo de Lleida de 2004 en el que se aprecia la ausencia de desgaste de los conos. Huevo sin desarrollo embrionario.

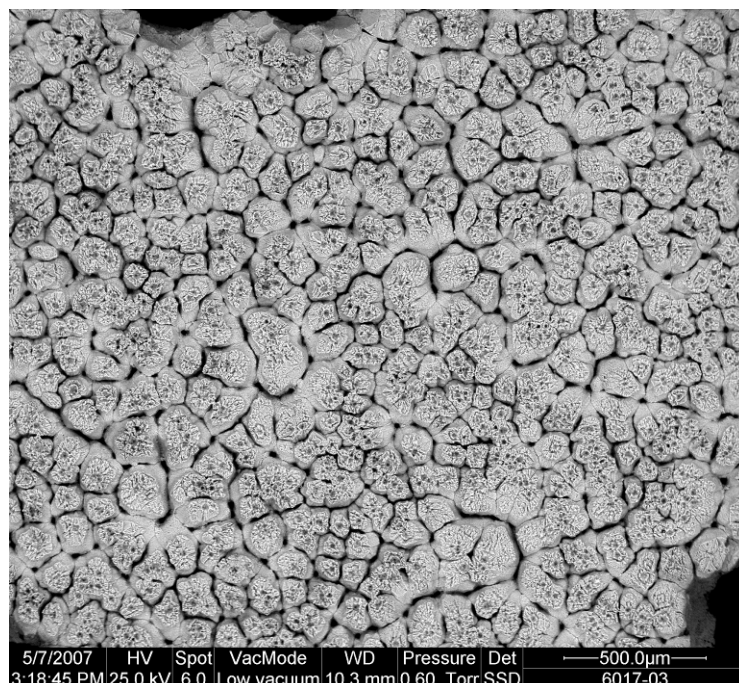


Imagen 5.38.: Detalle de la cara interna de la cáscara de un huevo de Lleida de 2003 en el que se aprecia el desgaste de los conos (los núcleos mamilares son visibles) por lo que hubo desarrollo embrionario.

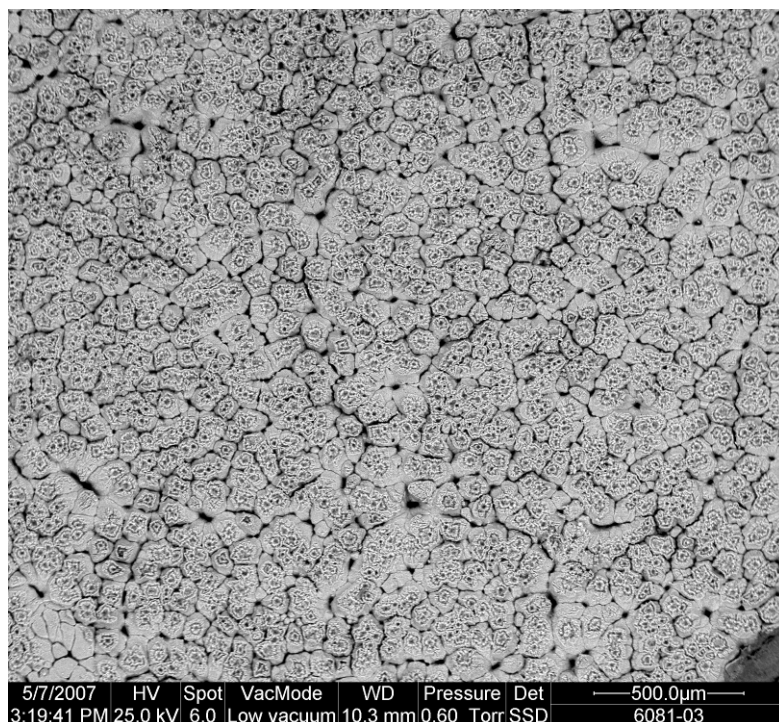


Imagen 5.39.: Cara interna de la cáscara de un huevo de Lleida de 2003 en el que se aprecia desgaste de los conos y morfología heterogénea de los conos. Solomon (1997) encontró que estos cambios aparecen en hembras jóvenes.

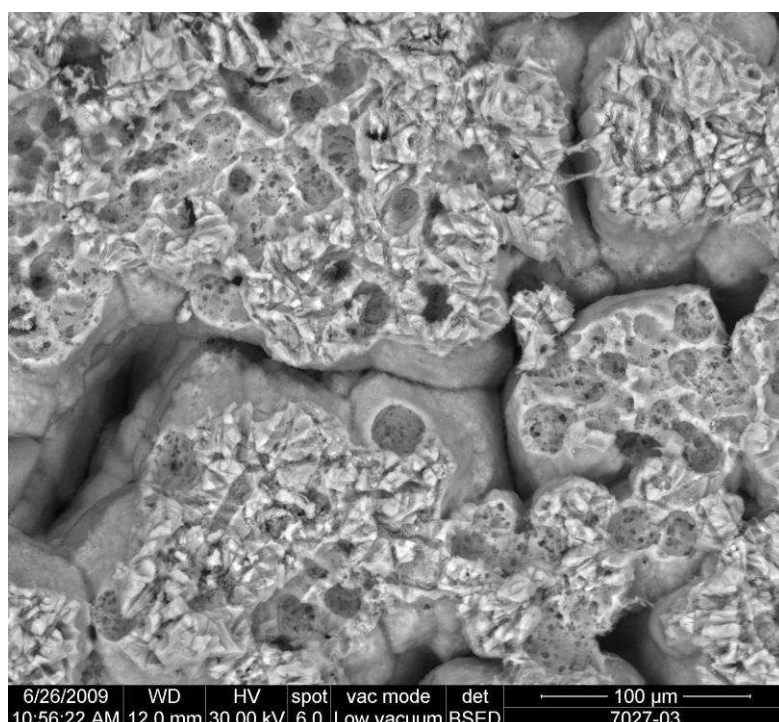


Imagen 5.40.: Cara interna de la cáscara de un huevo sin desarrollo embrionario de Lleida de 2009 en el que se aprecia la presencia de varios núcleos mamilares en cada cono basal.

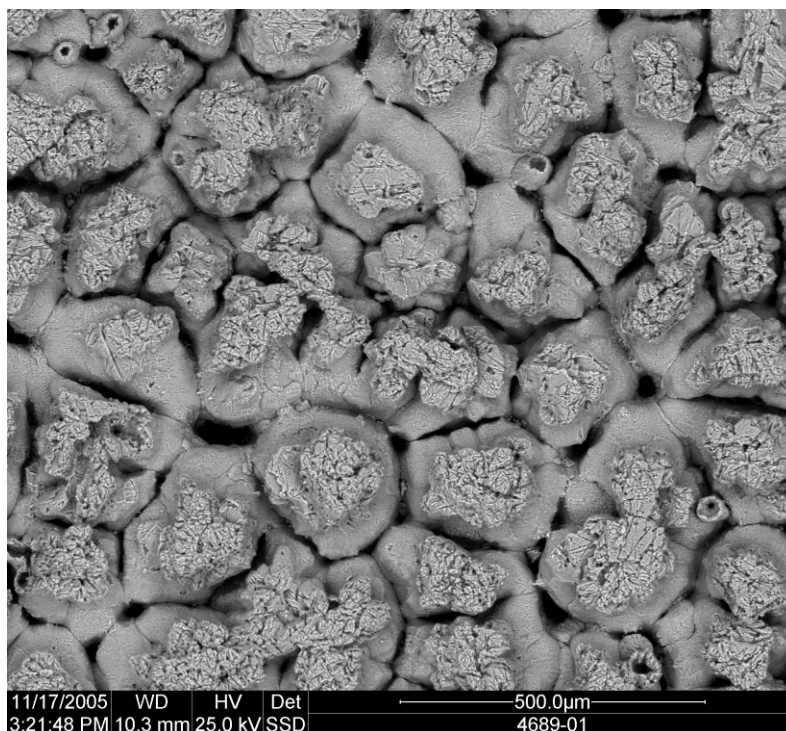


Imagen 5.41.: *Detalle de la cara interna de la cáscara de un huevo de Córcega (2001) en la que se aprecia la presencia de conos tipo "B".*

Dentro de los huevos fértiles ($n = 58$), un 62,07 % (40 % del total) presentaban un desarrollo embrionario avanzado, no siendo posible determinar, estudiando la ultraestructura, si el pollo llegó a nacer o si el aborto se produjo en los últimos días de la incubación. A efectos demográficos o de biología de la reproducción no es trascendente hacer esta diferenciación entre un aborto en el final de la incubación o la muerte del recién nacido.

5.2.5. Morfometría Ultraestructural de los huevos actuales.

Los resultados del estudio morfométrico ultraestructural de las 90 cáscaras del periodo actual examinadas quedan reflejados en la Tabla 5.11.

Como se ha encontrado en los huevos antiguos de museo, la capa de mayor espesor es la capa palizada, en este caso representando de media, un 55.23 %, porcentaje algo menor que en los huevos antiguos. Al igual que ocurría con los huevos antiguos y la biometría de los huevos, existe un gran rango de variación en la morfometría dentro de las muestras estudiadas.

Se ha encontrado (Tabla 5.12) que los huevos fértiles son significativamente mas largos que los huevos infértiles (One Way ANOVA, $df = 18$, $F = 4.48$, $p = 0.036$). Presentan el espesor la capa palizada y el índice de Ratcliffe mayor, y el Índice de Cooke menor aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. En los demás parámetros, las diferencias no son importantes ni estadísticamente significativas.

	X ± SD	Min	Max	n
Espesor	544.0 ± 74.5	368.5	727.0	90
C. Mamilar	127.0 ± 30.0	62.6	232.3	90
C. Palizada	300.6 ± 50.2	294.0	449.9	90
C. Reticular	122.5 ± 28.9	66.7	205.5	90
Ancho Conos	65.6 ± 25.6	22.2	131.8	90
I. Ratcliffe	3.7 ± 0.5	2.3	4.6	90
I. Cooke	0.5 ± 0.1	0.2	0.9	90
Diámetro poros	17.1 ± 4.8	8.8	34.1	88
Densidad poros	90.5 ± 14.3	56.0	130.0	88
AFPT	1544.7 ± 429.2	614.8	2874.3	88
Dureza cáscara	1745.4 ± 284.5	969.5	2273.3	90
WVC	67.5 ± 21.0	23.6	120.4	88
Espesor arcillas	6.2 ± 3.1	0.9	15.3	90
Índice impregnación	3.0 ± 2.9	1.0	1.9	88

Tabla 5.11. Morfometría ultraestructural de los huevos de Quebrantahuesos del periodo actual.

	X ± SD	Min	Max	n
FERTILES				
Espesor	552.0 ± 72.1	399.5	727.0	58
C. Mamilar	130.3 ± 33.10	62.6	232.3	58
C. Palizada	301.9 ± 47.72	188.3	449.9	58
C. Reticular	125.9 ± 32.48	66.7	205.0	58
I. Ratcliffe	3.6874 ± 0.4804	2.5264	4.5673	58
I. Cooke	0.4556 ± 0.1290	0.1786	0.8846	58
INFERTILES				
Espesor	529.1 ± 77.68	368.5	645.6	32
C. Mamilar	120.8 ± 22.54	85.7	165.0	32
C. Palizada	298.2 ± 55.05	183.6	405.1	32
C. Reticular	116.3 ± 19.82	74.8	149.9	32
I. Ratcliffe	3.5943 ± 0.5295	2.3077	4.3356	32
I. Cooke	0.4899 ± 0.1007	0.3214	0.7500	32

Tabla 5.12. Morfometría ultraestructural de los huevos de Quebrantahuesos del periodo actual según la fertilidad.

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la morfometría ultraestructural entre los huevos con diferentes órdenes de puesta ni entre las diferentes poblaciones.

Se han encontrado variaciones estadísticamente significativas entre los diferentes periodos establecidos. Así, el espesor de la cáscara disminuye a partir del 2001 y sobre todo disminuye mas a partir del 2006 (ANOVA, $df = 3$, $F = 7.73$, $p < 0.001$). El Índice de Ratcliffe disminuye también a partir de 2001 (ANOVA, $df = 3$, $F = 8.77$, $p < 0.001$), y aunque es ligeramente mayor en el periodo 2006-2012, las diferencias entre estos dos periodos no son estadísticamente significativas. El espesor de la capa reticular (ANOVA, $df = 3$, $F = 12.19$, $p < 0.001$), de la capa palizada (ANOVA, $df = 3$, $F = 5.36$, $p = 0.002$), de la capa mamilar (ANOVA, $df = 3$, $F = 3.30$, $p = 0.024$), el ancho de los conos basales (ANOVA, $df = 3$, $F = 13.30$, $p < 0.001$) y la dureza de la cáscara (ANOVA, $df = 3$, $F = 9.24$, $p < 0.001$) siguen la misma evolución que el espesor, disminuyendo desde 2001 y acentuando el descenso a partir de 2006.

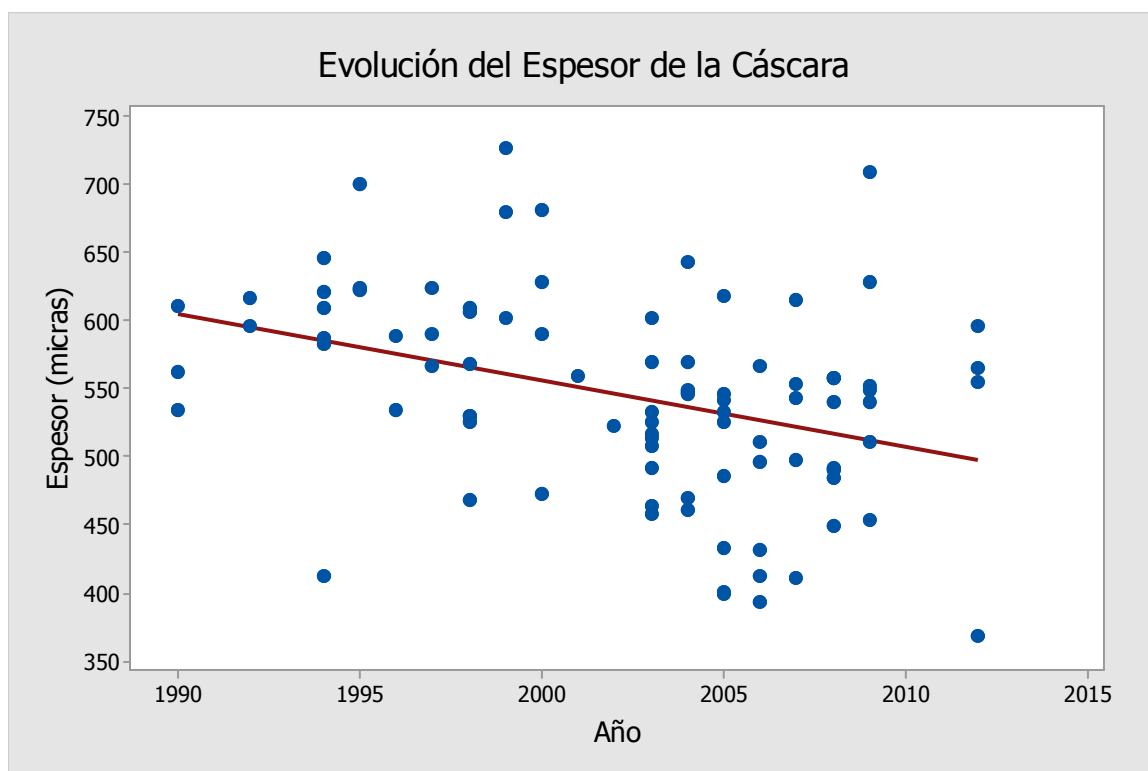


Figura 5.4.: Evolución temporal del espesor de la cáscara de los huevos de Quebrantahuesos en el periodo de estudio y la tendencia negativa encontrada.

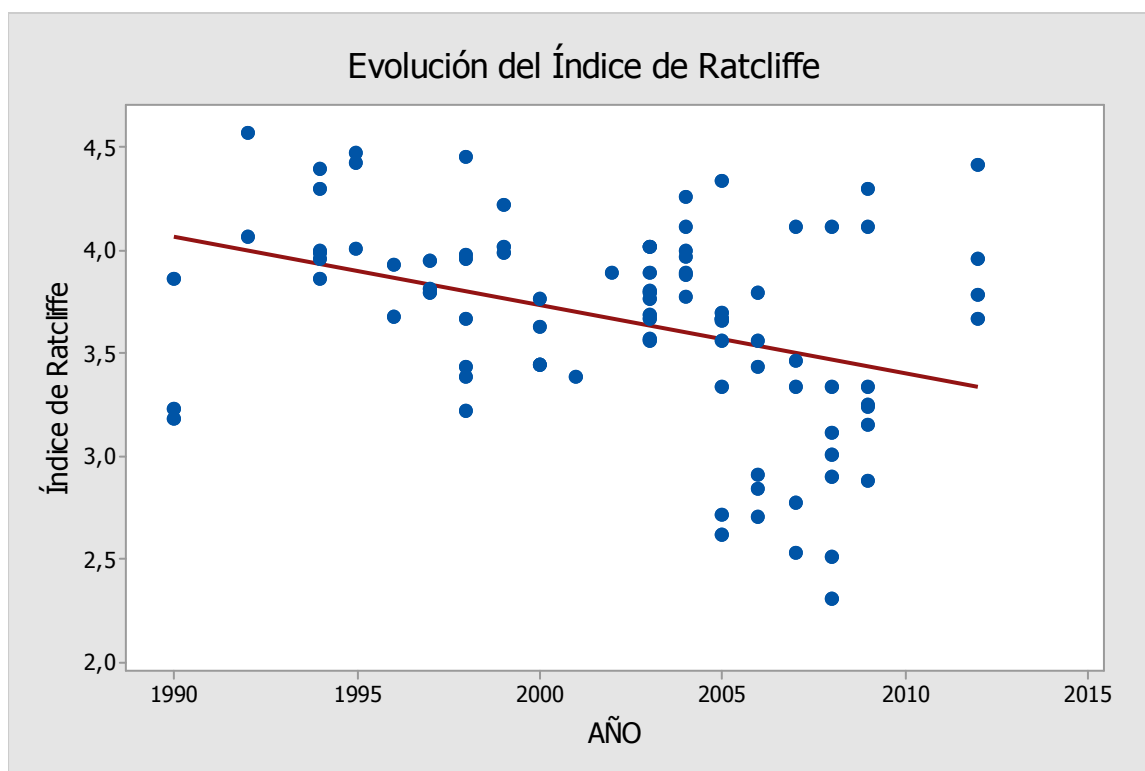


Figura 5.5.: Evolución temporal del Índice de Ratcliffe en el periodo de estudio y la tendencia negativa encontrada.

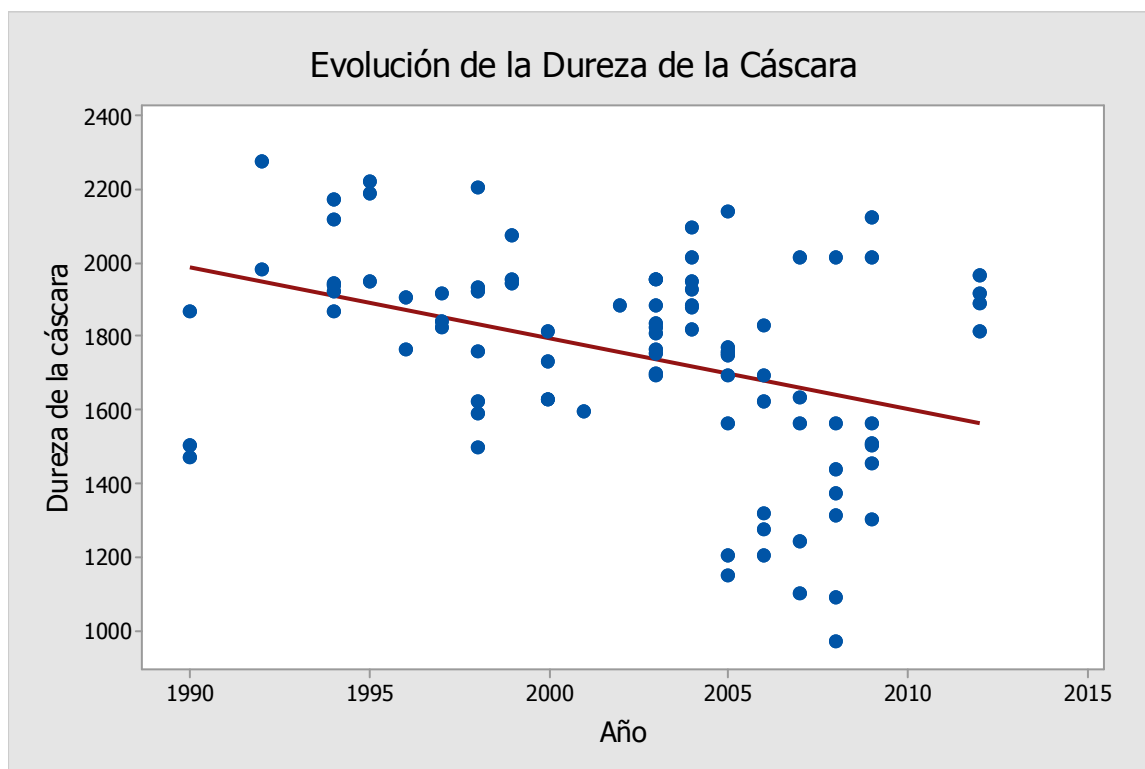


Figura 5.6.: Evolución temporal de la dureza de la cáscara de los huevos de Quebrantahuesos en el periodo de estudio y la tendencia negativa encontrada.

CAPITULO 6. DISCUSIÓN

6. Discusión

La generalización del uso de pesticidas organoclorados, principalmente en agricultura, tuvo efectos nefastos a mediados del siglo pasado en las poblaciones de aves silvestres y, en particular, en las aves de presa (Ratcliffe, 1967). Los compuestos derivados del DDT provocan una disminución del espesor de la cáscara de los huevos (Ratcliffe, 1970; Newton, 1973; Peakall y Cade, 1975). A raíz de ser detectados los efectos producidos por la contaminación química, el estudio de la ultraestructura y la biometría de la cáscara de los huevos de aves silvestres recibieron una especial atención (Fox, 1976; Cooke, 1979; Kiff et al., 1979; Bland, 1992). Posteriormente, se describieron alteraciones ultraestructurales y en la cristalización de la cáscara de huevos contaminados con DDE que conducían a la muerte embrionaria, por alteración en el intercambio gaseoso, sin que hubiera descensos significativos en el espesor de la cáscara (Kiff et al., 1979; González e Hiraldo, 1988; Peakall y Lincer, 1995). Desde entonces, el estudio ultraestructural de la cáscara se ha revelado como una herramienta fundamental para valorar los efectos de la contaminación por DDE y su influencia en la fertilidad (Hernández et al., 2008).

El estudio de huevos antiguos nos ha permitido caracterizar la estructura de la cáscara y establecer los parámetros de referencia de morfología y morfometría ultraestructural en el Quebrantahuesos, al evitar la posible influencia que ha podido tener la contaminación química en tiempos recientes. La ultraestructura de la cáscara del Quebrantahuesos se corresponde con la descrita en las restantes falconiformes que hasta la fecha han sido estudiadas (Board, 1982; Cooke, 1979; Bland, 1992). La cáscara tiene una estructura trilaminar y reticular, según la descripción de Board (1982).

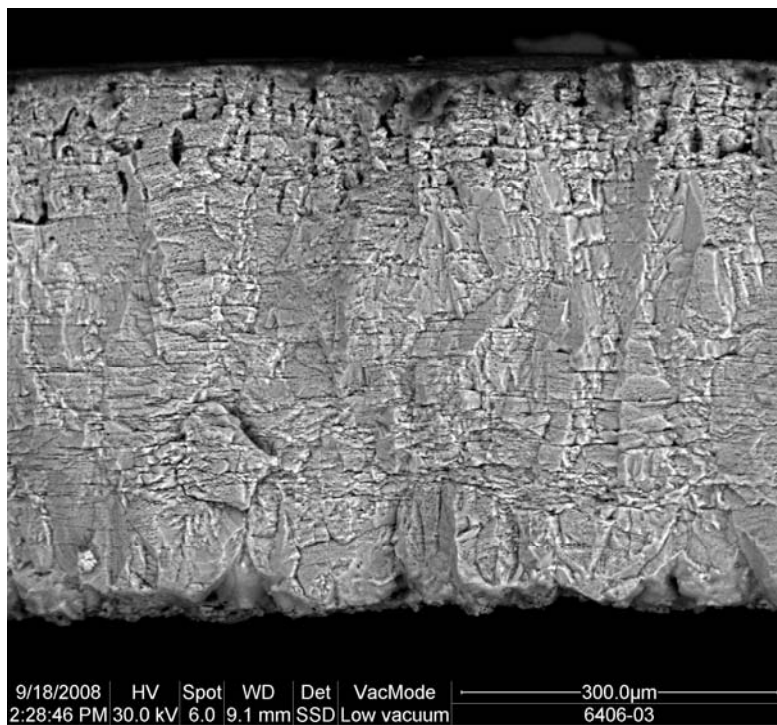


Imagen 6.1.: Imagen ultraestructural del corte trasversal de un fragmento de cáscara encontrado en un antiguo nido de Quebrantahuesos en la provincia de Murcia y remitido para comprobar si pertenecía a un huevo de Quebrantahuesos.

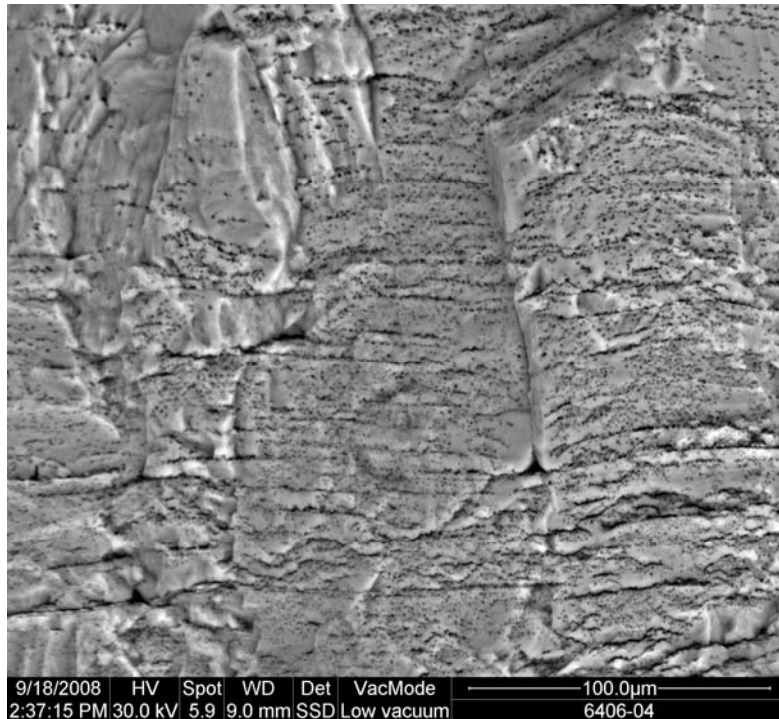


Imagen 6.2.: Detalle del fragmento de la Imagen 6.1 en la que se aprecia la estructura estratificada de la capa palizada típica del Buitre leonado y que la distingue de otros buitres y otras aves rupícolas.

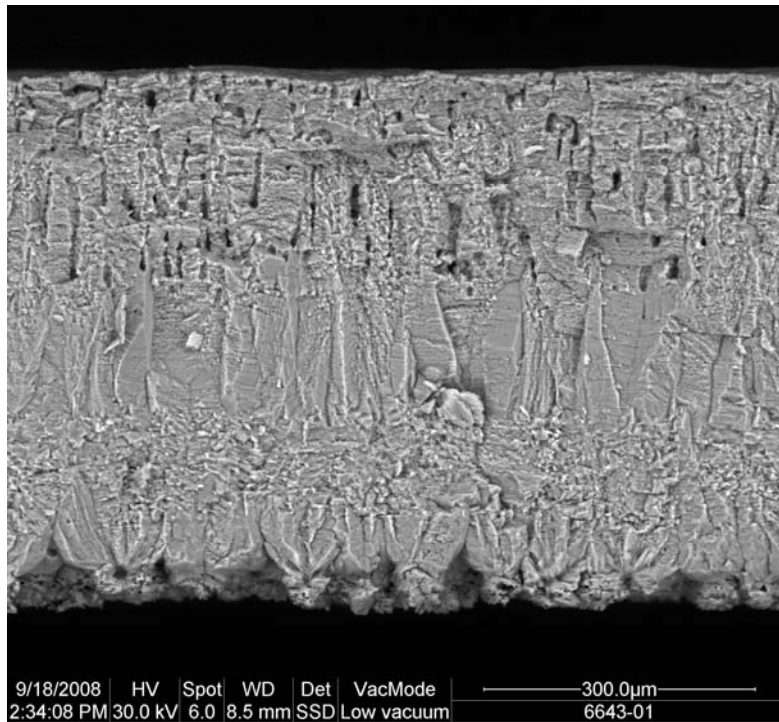


Imagen 6.3.: Imagen ultraestructural del corte trasversal de un fragmento de cáscara de un huevo de Buitre leonado del Refugio de Rapaces de Montejo (2008) en la que se aprecia la estructura estratificada de la capa palizada.

La porción calcificada de la cáscara se compone de tres capas, esponjosa, palizada y mamilar (Board, 1982), con la capa externa de tipo reticular con una compleja red de micro y mesoporos y con macroporos que atraviesan la cáscara de tipo tubular simple (Tyler, 1969; Bland, 1992). La capa palizada representa el 60 % del espesor total de la cáscara. En ninguna de las cáscaras estudiadas, ni antiguas ($n = 8$) ni actuales ($n = 90$) se ha encontrado la capa cristalina superficial (Cooke, 1989).

Se ha observado, tanto en los huevos antiguos como en los actuales, que existe una enorme variabilidad en la biometría de los huevos y la morfometría ultraestructural, presentando todos los parámetros unos rangos de variación muy superiores a los esperados (Bland, 1992; Hernández et al., 2008; Burnett et al., 2013). Se ha encontrado en algunas aves de presa que existen diferencias estadísticamente significativas en la morfometría de los huevos y la cáscara entre las diferentes poblaciones aisladas (Helander et al., 2002), de forma que no es posible la extrapolación o la comparación directa entre ellas (Hernández et al., 2008). El Quebrantahuesos en el Pirineo presenta acumulada toda la variabilidad que presentan las poblaciones aisladas de otras especies si las consideramos como un conjunto. En los huevos antiguos de museo, por ejemplo, la longitud de los huevos presentaba un rango de variación de entre 72.5 y 96.4 mm ($n = 63$) y en los actuales de entre 80.6 y 94.3 ($n = 27$), o, por ejemplo, el espesor de la cáscara varió entre 391 y 714 μ en los huevos antiguos ($n = 8$) o entre 368 y 727 μ ($n = 90$). Parece como si hubiera habido poblaciones separadas que en un momento determinado entraron en contacto y formaron una única población. Se ha considerado al Quebrantahuesos como un mal colonizador (Hiraldo et al., 1979). Sin embargo esta variabilidad encontrada podría ser el reflejo de todo lo contrario, de una gran capacidad adaptativa. El Quebrantahuesos estaba antaño distribuido por toda la geografía ibérica, en regiones ecoclimáticas y biogeográficas muy diferentes (de las altas cumbres del Pirineo a Sierra Morena, de la Sierra de Aracena, a la Cordillera Cantábrica o del Sistema Ibérico a Los Alcornocales de Cádiz).

La cáscara del Quebrantahuesos presenta suficientes caracteres ultraestructurales como para permitir su identificación con un alto grado de fiabilidad, y, de hecho, la microscopía electrónica de barrido ha sido empleada en numerosas ocasiones a lo largo del periodo de estudio para determinar la identidad de fragmentos de cáscara (Imágenes 6.1 y 6.2) o determinar si los fragmentos pertenecían a la temporada de cría en que se intervenían o a temporadas anteriores.

En los huevos antiguos depositados en museo y que han podido ser examinados, se observó que en la mayoría no había habido desarrollo embrionario, indicando que la retirada de las puestas por los coleccionistas se realizaba al principio de la incubación. Posiblemente había nidos de fácil acceso que eran expoliados de forma reiterada y sin mucha dilación tras la puesta, al existir mucha competencia por parte de los coleccionistas. En el Anexo I podemos ver que muchos nidos eran expoliados de forma sistemática durante años consecutivos, mientras que en el Anexo II se puede ver que los huevos y puestas alcanzaban un considerable valor económico y estaban sometidas a un intenso comercio. En uno de los huevos antiguos examinados no había habido desarrollo embrionario y había sido colectado muy tarde, a finales de marzo. Las fechas de colecta de los huevos y puestas depositados en los museos indican que los Quebrantahuesos

tenían la misma fenología que en la actualidad. Hemos podido comprobar también, que los barros que impregnan la cáscara tienen una composición idéntica a la actual.

Se han identificado importantes diferencias en la ultraestructura de la cáscara entre el ecuador del huevo y el polo ancho, donde la cáscara es mas fina y la capa reticular externa se organiza en protuberancias denominadas mamelones (Solomon, 1997). Aunque el espesor es menor, posiblemente esta organización de la capa reticular consiga facilitar la rotura por parte del pollo en el momento del nacimiento sin mermar de forma significativa la resistencia de la cáscara a ese nivel (Massaro y Davis, 2005; Balkan et al., 2006).

Estas variaciones en el espesor y la ultraestructura en el polo ancho del huevo deben de tenerse en cuenta a la hora de estudiar fragmentos de cáscara ya que la referencia morfológica y morfométrica se ha establecido en la cáscara a nivel del ecuador del huevo. Afortunadamente, la ultraestructura del polo ancho presenta características suficientes como para poder identificarlo.

Se ha encontrado también la formación de esferulitas en la cutícula externa en huevos que no estaban contaminados y cuya composición coincidía con la descrita por Garret (1973), por lo que deben considerarse como variaciones normales de la cáscara, al igual que se han encontrado en otras aves (Observación personal). Igualmente se han encontrado en huevos no contaminados y viables de Quebrantahuesos la formación de concreciones cálcicas globulares de estructura no cristalina embebidas en la capa reticular, o la presencia de conos basales tipo B (Solomon, 1997) y que también deben considerarse como variaciones normales de la cáscara. Este último autor considera la presencia de los conos tipo B y la variabilidad en la morfología de los conos como típicos de hembras jóvenes.

Un hecho llamativo es también que los huevos actuales presentan mayor longitud que los huevos antiguos (Tabla 5.7). Sin embargo, aunque el peso fresco es también mayor en la actualidad, las diferencias no son estadísticamente significativas. Estas mismas diferencias se han encontrado en la actualidad entre los huevos fértiles y los huevos infértiles (Tabla 5.9), lo que podría indicar que la proporción de huevos infértiles en la muestra de huevos antiguos fuera significativamente mayor que en la de los actuales.

La gran variabilidad encontrada en todos los parámetros biométricos probablemente está enmascarando diferencias que se han detectado durante la incubación artificial en relación al orden de puesta. Se ha observado que los primeros huevos suelen ser mas largos, menos anchos, con menor volumen y con la cáscara mas gruesa (variaciones normales de la cáscara, al igual que se han encontrado en otras aves (Observación personal). Se ha observado también que ambos huevos de la misma puesta deben ser incubados artificialmente con diferentes condiciones de humedad relativa, ya que sino o uno de ellos pierde en exceso o el otro apenas pierde peso durante la incubación, comprometiéndose en ambos casos su viabilidad. Sin embargo, las diferencias biométricas y ultraestructurales entre los primeros y los segundo huevos no son estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros cuando valoramos la población en conjunto. Únicamente se detecta una similitud entre los primeros huevos y los huevos de puestas

únicas, por lo que es el segundo huevo el que es en realidad, diferentes (Margalida et al., 2014).

Los huevos del Pirineo axial tienen significativamente menor tamaño, peso fresco y volumen que los huevos de las Sierras Exteriores o el Prepirineo (Tabla 5.10), y son muy homogéneos entre las dos últimas poblaciones entre sí. Posiblemente estas variaciones en el tamaño sean un mecanismo de adaptación de las condiciones ambientales a las que se tiene que desarrollar la incubación a mayores altitudes (Rahn y Ar, 1974). A mayores altitudes, aumenta el coeficiente de difusión del agua en el aire y, por tanto, la conductividad del vapor de agua a través de la cáscara, lo que conduce a una mayor pérdida de agua durante la incubación (Ar y Rahn, 1978). Las aves desarrollan varios mecanismos para compensar esta mayor pérdida, como disminuir el gradiente de vapor de agua criando en cuevas (con mayor humedad relativa en el ambiente), aumentando la relación albúmen:yema (que aumenta el contenido hídrico del huevo) o disminuyendo el coeficiente de difusión de agua a través de la cáscara, modificando la superficie total de poros (Rahn y Ar, 1974).

Sin embargo, los huevos incubados a mayores altitudes sufren también pérdidas de dióxido de carbono además del agua, y éstas podrían ser letales para el embrión. La regulación del número y tamaño de poros de la cáscara compensa la excesiva difusión de vapor de agua y dióxido de carbono, pero también se modifica de forma significativa el aporte de oxígeno al embrión, lo que podría comprometer su viabilidad (Carey, 1980). Por ello, la estrategia mas efectiva parece ser la reducción del tamaño del huevo para, así, disminuir la superficie de la cáscara y controlar la difusión del vapor de agua sin modificar los coeficientes de difusión ni comprometer la viabilidad del embrión (Ar y Rahn, 1974; Carey, 1980).

Se ha demostrado que las gallinas en altas altitudes son capaces de formar cáscaras con la conductancia adecuada a las diferentes condiciones ambientales (Rahn et al., 1977; Carey, 1980; Board, 1982). El proceso de formación del huevo depende de las condiciones ambientales (Tullet, 1975). Así, a mayores altitudes las aves hiperventilan y los cambios en la concentración sanguínea de CO₂ y del pH sanguíneo (hipocapnia y acidosis) serían los responsables de estos cambios ultraestructurales adaptativos (Rahn y Ar, 1974; Carey, 1980). Otra vez, este hecho parece indicarnos que el Quebrantahuesos presenta una enorme versatilidad que le proporciona una gran capacidad adaptativa a las condiciones del entorno.

Una característica que diferencia al Quebrantahuesos de otras especies de buitres es la utilización de baños cosméticos en aguas y barro ferruginosos para adquirir la pigmentación típica del plumaje (Margalida, 2000). El análisis semicuantitativo que hemos realizado en plumas de ejemplares adultos e inmaduros indica que es el mismo que el que impregna la superficie externa de los huevos (Hernández, 2005b) y está formado por una mezcla de arcillas y feldespatos (silicatos de aluminio y magnesio) con gran cantidad de hierro y oxígeno (óxido de hierro).

La coloración del huevo no siempre es debida a la presencia de restos de barro del plumaje que lo impregnan externamente. Hay huevos sin apenas impregnación de barro que presentan un color anaranjado por la presencia de porfirinas en la cutícula externa (Gosler et al, 2005). Hay que diferenciar la impregnación con barro de la pigmentación.

Todos los huevos tienen mayor o menor contaminación de barros cosméticos en la superficie externa, como demuestra que en todos los análisis aparece invariablemente óxido de hierro en la superficie externa. Sin embargo, ni el espesor de la capa de barro externa ni el Índice de impregnación que definimos, guarda relación con ninguno de los parámetros estudiados, lo que invariablemente nos conduce a pensar que la impregnación con el barro es accidental y no tiene ninguna función en la incubación.

En un principio se pensó que la presencia de este barro en la cáscara podría tener alguna influencia en la incubación, sobre todo en algunos huevos que presentan una capa de grosor considerable (Hernández, 2005b). Sin embargo, un examen mas detallado de la cutícula externa (Imágenes 3.37 y 3.38) revela que, tanto la cutícula externa como la capa de barro, están dispuestas de forma que permiten la apertura de los poros, por lo que su presencia no altera el intercambio gaseoso. Las diferencias encontradas en las pérdidas diarias de peso entre huevos durante la incubación artificial (Hernández, 2005b) posiblemente sean debidas a diferencias morfológicas que influyen en la conductividad de la cáscara antes que la presencia de barros en la superficie.

Los niveles de los diferentes pesticidas organoclorados y PCBs totales encontrados en los huevos analizados ($n = 20$) son muy bajos (Hernández et al., 1986; 1988 y 1989) e indican un bajo grado de contaminación de la población, confirmando los resultados obtenidos en el Quebrantahuesos con anterioridad (Hernández, 2005a). En España todavía en la actualidad se detectan en aves de presa niveles altos de pesticidas organoclorados, afectando principalmente a rapaces ornitófagas y a aves que invernán en el norte de África y el Sahel (Hernández, 2010). En un estudio que realizamos sobre la influencia de los pesticidas organoclorados en los parámetros reproductivos del Águila imperial, encontramos que las águilas en Doñana presentaban niveles de contaminación por DDE significativamente mayores que en otras poblaciones y eran los responsables de los problemas de fertilidad que presentaban desde hacía décadas (Hernández et al., 2008). Esta contaminación tenía su origen en un mayor consumo de aves migratorias y aves acuáticas. De hecho, el mayor nivel de DDE encontrado en un huevo de un ave de presa en toda Europa desde que se monitorizan los niveles de contaminación en aves silvestres, se registró en un huevo de una pareja de Águila imperial de Doñana en el año 1986 (38.04 ppm ww). De hecho, incluso en la reintroducida población de Cóndor de California, se ha encontrado en la actualidad que las parejas de la población costera que consumen carroña de mamíferos marinos están significativamente mas contaminadas con DDE, presentan menores índices de fertilidad y mayor fracaso reproductor que las poblaciones del interior de California (Burnett et al., 2013). Aún en la actualidad, rapaces ornitófagas como el Águila perdicera o el Halcón peregrino y aves migradoras con invernada en el norte de África, como el Cernícalo primilla, la Cigüeña negra, siguen todavía sufriendo los efectos del DDE sobre la reproducción y la ultraestructura de la cáscara de los huevos (Hernández, 2010).

Se han detectado niveles de lindano (γ -HCH) y sus isómeros en algunos huevos (Tabla 5.3). El lindano se metaboliza y excreta eficientemente en aves, siendo mínimamente acumulado en tejidos y por tanto con poca importancia ecotoxicológica en términos de fertilidad y desarrollo embrionario. Los niveles de lindano encontrados están muy por debajo de las 5.5 ppm ww descritas por Henny et al. (1983) en cernícalo americano y que no causaron descensos significativos en productividad y fertilidad. Ash y Taylor (1964) encontraron en faisanes (*Phasianus colchicus*) que en huevos que contenían

al menos hasta 10 ppm de β -hexaclorociclohexano no se producían alteraciones significativas en la fertilidad, éxito reproductor, desarrollo embrionario o supervivencia de pollos.

Los niveles medios de lindano y otros isómeros del HCH están aumentados por la presencia de dos huevos infértiles de una misma puesta del año 1992 con niveles significativamente mayores que el resto. Estos dos huevos pertenecían a una pareja localizada en una zona que sufrió la influencia de varios vertidos y fugas producidos pocos años antes de una fábrica de lindano en Sabiñánigo (Hernández et al., 1991).

De los cinco derivados analizados (heptacloro, heptacloro epóxido, α -clordano, β -clordano y oxiclordano) sólo se han detectado niveles de los dos primeros. Aún siendo el clordano el primer insecticida ciclodiénico usado en agricultura, no existen datos en la bibliografía sobre los efectos del oxiclordano sobre la reproducción de las aves. Niveles de 3 a 15 ppm de clordano comercial en la dieta no produjeron alteraciones significativas en la reproducción del colín de Virginia (*Colinus virginianus*) ni de 8 ppm en la dieta de ánades (*Anas platyrhynchos*) (Stickel et al., 1979).

El clordano comercial es una mezcla de 45 compuestos, de los que se encuentran en mayor cantidad el *cis*-clordano (19%), el *trans*-clordano (24%), isómeros del clordano (21.5%), heptacloro (10%), y *cis* y *trans*-nonaclor (7%) (Eisler, 1970). En vertebrados, el heptacloro se metaboliza rápidamente a heptacloro epóxido. El nivel crítico de heptacloro epóxido en rapaces se ha establecido en 1.5 ppm. A partir de ese nivel en huevos, la productividad se reducía de forma significativa (Henny et al., 1983). Se ha encontrado que niveles de heptacloro epóxido en huevos de Halcón de las praderas (*Falco mexicanus*) y Esmerejones (*Falco columbarius*) entre 0.2 y 0.4 ppm no afectaron de forma significativa la reproducción (Fyfe et al., 1976; Henny et al., 1983). Los niveles que hemos encontrado en el Quebrantahuesos son mucho menores que los descritos como críticos para la reproducción en aves de presa por estos autores.

De los cinco pesticidas ciclodiénicos sintetizados para su uso comercial en agricultura, son el aldrin, dieldrin y endrin los que se detectan en huevos de aves de presa en España. El aldrin, aunque se utiliza ampliamente, se suele detectar en menor concentración que el dieldrin, ya que se metaboliza rápidamente y es convertido en este último compuesto. El endrin, aunque es potencialmente mucho más tóxico que el dieldrin, rara vez produce efectos ecotoxicológicos acumulativos ya que tiene una persistencia ambiental mucho menor que éste. Los niveles encontrados de estos pesticidas en los huevos de Quebrantahuesos son despreciables.

Los niveles de DDT y de su principal metabolito (el *p,p'*-DDE) se encuentran muy alejados al límite establecido como crítico (Figura 5.1), asociado a disminuciones significativas en la fertilidad y éxito reproductor en la mayoría de las aves de presa (Nisbet, 1989; Helander et al., 2002). Definitivamente se confirma que la contaminación por DDE no es el responsable de las pérdidas o descensos en la productividad y éxito reproductor (Figuras 1.1 y 1.2) de las parejas que se ha observado en los últimos años (Hernández, 2005a).

Por último, los bifenilos policlorados es un grupo de hidrocarburos clorados aromáticos de uso general. Son el resultado de la cloración de bifenilos, produciéndose

complejas mezclas de clorobifenilos con un total de 209 teóricamente posibles isómeros con 10 posibles grados de cloración. Los PCB's, al igual que las dioxinas, son compuestos biológicamente tóxicos con persistencia ambiental elevada, resistiendo la degradación bacteriana y química y que se biomagnifican a lo largo de la cadena trófica (Wiemeyer et al., 1986). Aunque es difícil extrapolar los resultados de un grupo taxonómico de aves a otro, en general se puede decir que por debajo de las 5 ppm ww los PCBs no tienen efectos sobre la viabilidad de los huevos (Kiff et al., 1979), mientras que por encima de 15 ppm la mortalidad embrionaria es alta (Elliot et al., 1996a). El nivel crítico se ha establecido en 4 ppm para ejercer efectos apreciables en la viabilidad de los huevos (Helander et al. 2002). De hecho, se ha comprobado que niveles de hasta 17.8 ppm no afectaban a la reproducción de forma significativa en Estrigiformes (McLane y Hughes, 1980).

La fertilidad global encontrada en la muestra de huevos actuales es muy elevada, aún estando infravalorada por la dificultad de diferenciar un huevo infértil de un huevo fértil sin desarrollo embrionario (Hernández, 2005b). Esta elevada fertilidad no se corresponde con una población que estuviera sufriendo los efectos de la contaminación química (Kiff et al., 1979; Hernández et al., 2008). Además, el fracaso reproductor se ha producido en un elevado porcentaje de casos estudiados (62.07 % de los huevos fértiles y el 40 % del total de huevos estudiados) al final del desarrollo embrionario o poco tiempo después del nacimiento, lo que no es característico de la contaminación química. Estos resultados coinciden con los hallazgos del trabajo de campo (Margalida y Bertran, 2000; Margalida et al., 2003). No se puede hablar, por tanto, de infertilidad sino de fracaso reproductor (Hernández, 2005b).

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los huevos en función de la fertilidad (Tabla 5.12). Así, los huevos fértiles son significativamente más largos, con mayor espesor y densidad de la cáscara (Índice de Ratcliffe), por lo que podría considerarse que los huevos fértiles son huevos de mayor "calidad" que los infértiles (Solomon, 1997).

Así, la tendencia general observada a partir del 2001, y, en especial, a partir de 2006, a la disminución paulatina del espesor de la cáscara (Figura 5.4), Índice de Ratcliffe (Figura 5.5) y Dureza de la cáscara (Figura 5.6) así como de otros parámetros ultraestructurales, podrían estar indicándonos que el Quebrantahuesos están sufriendo una progresiva pérdida de calidad de los huevos (Solomon, 1997). Estos cambios podrían ser un reflejo del impacto de la aplicación de las políticas sanitarias contrarias a la conservación de especies carroñeras (Tella, 2001; Donázar et al., 2009), que conllevan a una reducción drástica de recursos tróficos al proceder al cierre de muladares tradicionales y a la retirada y destrucción de los cadáveres de animales domésticos (Oro et al., 2008). Se ha demostrado que esta reducción ha influido muy negativamente en el éxito reproductor, el crecimiento de la población y en el incremento de la mortalidad juvenil en el Buitre leonado, y ha sido la responsable de importantes cambios en la dieta y su comportamiento (Donázar et al., 2010; Zuberogoitia et al., 2010).

En el Quebrantahuesos ya se han apreciado cambios atribuidos a esta reducción de recursos tróficos (Margalida et al., 2014), a pesar de que los puntos de alimentación suplementaria pueden amortiguar los efectos (Oro et al., 2008). Así, la supervivencia subadulto ha disminuido, el inicio de la reproducción se ha retrasado y la proporción de

puestas dobles ha disminuido (Margalida et al., 2014). La progresiva pérdida de calidad de los huevos del Quebrantahuesos encontrada desde 2006 podría ser también un reflejo de esta reducción en recursos tróficos, ya que se ha comprobado que en el Quebrantahuesos la reducción en los recursos tróficos no afecta al porcentaje de parejas que realizan puesta al tener una dieta muy especializada (Margalida y Colomer, 2012), pero la condición física de la hembra reproductora si influye en el éxito de la reproducción (Margalida et al., 2012).

La reducción drástica de los recursos tróficos por aplicación de esta normativa sanitaria está provocando también un aumento de la mortalidad no natural por incremento de las áreas de campeo y a la explotación de otros recursos tróficos alternativos (Margalida et al., 2014). La aparición de un nuevo factor de mortalidad no natural, como ha ocurrido con la mortalidad por veneno, muy centrada en la población adulta y subadulta, tiene efectos devastadores sobre la dinámica de población de una especie longeva, de baja productividad y de elevada edad de primera reproducción como es el Quebrantahuesos (Oro et al., 2008; Margalida et al., 2014).

Los niveles de DDE y la carga total de organoclorados muestran una tendencia alcista en los últimos años, con una tendencia a incrementarse de forma significativa a partir de 2006 (Figuras 5.2 y 5.3). Esta evolución coincide en magnitud, aparición y tendencia con la observada en los parámetros de la cáscara (Espesor, Índice de Ratcliffe y Dureza) y con la paulatina pérdida de calidad de los huevos. Sin duda, estos cambios guardan relación con la forma de obtener alimento. Así, ante las restricciones en la disponibilidad de cadáveres de animales domésticos a las que ha llevado la normativa sanitaria europea, el Quebrantahuesos se está viendo forzado a ampliar el área e intensidad de campeo en busca de otro tipo de recursos tróficos (Margalida et al., 2014), lo que sin duda incrementa notablemente el riesgo de consumo de animales envenenados (Margalida et al., 2008) o de alimentos con mayor carga de tóxicos, como se pudo comprobar en el caso de la exposición al plomo (Hernández y Margalida, 2009). No en vano, el Quebrantahuesos se ha demostrado extremadamente sensible al uso de venenos (Hernández, 2010) y la intoxicación es la principal causa de mortalidad en los Pirineos (Margalida et al., 2008; Oro et al., 2008), desplazando a otras causas de mortalidad.

La combinación del incremento de la mortalidad subadulta, de la paulatina pérdida de calidad de los huevos, de las limitaciones en los recursos tróficos y la mayor exposición a tóxicos de los adultos, quizá sea el peor de los escenarios que se planteaban en los modelos demográficos establecidos en el estudio de la dinámica de la población pirenaica y de su futuro (Oro et al., 2008). En este contexto, el seguimiento de la reproducción y el estudio de las causas que llevan al fracaso reproductor se hace imprescindible (Hernández, 2005b). En la investigación de las causas del fracaso reproductor, el estudio de la ultraestructura de la cáscara ha demostrado jugar un papel crucial. En esta tesis se ha desarrollado, por tanto, una importante herramienta de trabajo en las actuaciones para la conservación del quebrantahuesos y otras especies en peligro de extinción.

CAPITULO 7. CONCLUSIONES

7. Conclusiones

- El Quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) es una de las especies mas amenazadas de Europa y se considera "en peligro de extinción", por lo que goza de la máxima protección legal en la Unión Europea. En tiempos se distribuyó en todos los sistemas montañosos de la Península, quedando relegado por la persecución directa e indirecta a una relictas población distribuida en los Pirineos. La población ha sido monitorizada intensamente desde 1985 y se implementaron medidas para garantizar su conservación que fueron muy efectivas, permitiendo que en apenas 20 años la población se triplicara. A partir de finales de los años 90, sin embargo, la productividad y el éxito reproductor fueron descendiendo de forma significativa sin que fuera debido al aumento poblacional sino al incremento de los fracasos en la reproducción. Por ello, se empezó a investigar las causas de este fracaso, incluyendo el estudio patológico sistemático de las puestas y huevos que fracasan.
- Uno de los principales problemas en la investigación de las causas del fracaso reproductor es su peculiar comportamiento reproductivo, que le hace elegir para la cría lugares inaccesibles y de difícil control y es, además, especialmente sensible a las molestias. En esta dificultad residía la importancia de desarrollar una herramienta que permitiera obtener la máxima información de los restos encontrados en el nido. El objetivo de esta tesis ha sido el desarrollo de esta herramienta mediante el estudio de la ultraestructura de la cáscara con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido.
- El estudio de huevos antiguos depositados en museos y colectados antes del uso generalizado de pesticidas, nos ha permitido caracterizar la estructura de la cáscara y establecer los parámetros de referencia de morfología y morfometría ultraestructural en el Quebrantahuesos, al evitar la posible influencia que ha podido tener la contaminación química en tiempos recientes. La ultraestructura de la cáscara del Quebrantahuesos se corresponde con la descrita en las restantes falconiformes que han sido estudiadas. La cáscara tiene una estructura trilaminar y reticular.
- La porción calcificada de la cáscara se compone de tres capas, esponjosa, palizada y mamilar, con la capa externa de tipo reticular con una compleja red de micro y mesoporos y con macroporos que atraviesan la cáscara de tipo tubular simple. La capa palizada representa el 60 % del espesor total de la cáscara. En ninguna de las cáscaras estudiadas, ni antiguas ni actuales, se ha encontrado la capa cristalina superficial descrita en otra aves.
- Se ha observado, tanto en los huevos antiguos como en los actuales, que existe una enorme variabilidad en la biometría de los huevos y la morfometría ultraestructural, presentando todos los parámetros unos rangos de variación muy superiores a los esperados. Sin embargo esta elevada variabilidad podría ser el reflejo de una gran capacidad adaptativa, ya que el Quebrantahuesos es capaz de habitar regiones ecoclimáticas y biogeográficas muy diferentes. La cáscara del huevo en el Quebrantahuesos presenta, por otro lado, suficientes caracteres ultraestructurales como para permitir su identificación con un alto grado de fiabilidad, y, así, la

microscopía electrónica de barrido puede ser empleada para determinar la identidad de fragmentos de cáscara.

- Se han identificado importantes diferencias en la ultraestructura de la cáscara entre el ecuador del huevo y el polo ancho, donde la cáscara es mas fina y la capa reticular externa se organiza en protuberancias denominadas mamelones, posiblemente para facilitar el nacimiento del pollo. Estas variaciones deben de tenerse en cuenta a la hora de estudiar fragmentos de cáscara, ya que la referencia morfológica y morfométrica se ha establecido en la cáscara a nivel del ecuador del huevo.
- Los huevos del Pirineo axial tienen significativamente menor tamaño, peso fresco y volumen que los huevos de las Sierras Exteriores o el Prepirineo, y son muy homogéneos entre las dos últimas poblaciones entre sí. Posiblemente estas variaciones en el tamaño sean un mecanismo de adaptación de las condiciones ambientales a las que se tiene que desarrollar la incubación a mayores altitudes. La estrategia mas efectiva, que es la adoptada por el Quebrantahuesos, parece ser la reducción del tamaño del huevo para, así, disminuir la superficie de la cáscara y controlar la difusión del vapor de agua sin modificar los coeficientes de difusión de oxígeno y dióxido de carbono y sin comprometer así la viabilidad del embrión.
- Una característica que diferencia al Quebrantahuesos de otras especies de buitres es la utilización de baños cosméticos en aguas y barros ferruginosos para adquirir la pigmentación típica del plumaje. El análisis semicuantitativo que hemos realizado en plumas de ejemplares adultos e inmaduros indica que este barro presente en las plumas es el mismo que el que impregna la superficie externa de los huevos y está formado por una mezcla de arcillas y feldespatos (silicatos de aluminio y magnesio) con gran cantidad de hierro y oxígeno (óxido de hierro). Sin embargo, la coloración del huevo no siempre es debida a la impregnación externa con restos de barro del plumaje, sino que algunos presentan un color anaranjado por la presencia de porfirinas en la cutícula externa. La presencia de estos barros no tiene ninguna función en la incubación.
- Los niveles de los diferentes pesticidas organoclorados y PCBs totales encontrados en los huevos analizados son muy bajos e indican un bajo grado de contaminación de la población, confirmando los resultados obtenidos con anterioridad. Los niveles de DDT y de su principal metabolito (el p,p' -DDE) se encuentran muy alejados al límite establecido como crítico, asociado a disminuciones significativas en la fertilidad y éxito reproductor. Definitivamente se confirma que la contaminación por DDE no es el responsable de las pérdidas o descensos en la productividad y éxito reproductor.
- La fertilidad global encontrada en la muestra de huevos actuales es muy elevada, aún estando infravalorada. Esta elevada fertilidad no se corresponde con una población que estuviera sufriendo los efectos de la contaminación química. Además, el momento en que se produce el fracaso, al final de la incubación y primeros días del pollo no es característico de la contaminación química.
- Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los huevos en función de la fertilidad, siendo los huevos fértiles significativamente mas largos, con mayor espesor y densidad de la cáscara (Índice de Ratcliffe), por lo que podría considerarse

que los huevos fértiles son huevos de mayor "calidad" que los infértiles. La tendencia general observada a partir del 2001, y, en especial, a partir de 2006, es una disminución paulatina del espesor de la cáscara así como de otros parámetros ultraestructurales, podrían estar indicando que el Quebrantahuesos están sufriendo una progresiva pérdida de calidad de los huevos. Estos cambios podrían ser un reflejo del impacto de la aplicación de las políticas sanitarias que están demostrando ser muy negativas para la conservación de especies carroñeras al conllevar a una reducción drástica de recursos tróficos.

- Los niveles de DDE y la carga total de organoclorados muestran también una tendencia alcista a partir de 2006. Esta evolución coincide en magnitud, aparición y tendencia con la observada en los parámetros de la cáscara y con la paulatina pérdida de calidad de los huevos. Estos cambios guardan relación con la forma de obtener alimento ya que las restricciones en la disponibilidad de cadáveres de animales domésticos a las que ha llevado la normativa sanitaria europea, está forzando al Quebrantahuesos a ampliar el área e intensidad de campeo en busca de otro tipo de recursos tróficos de menor calidad, lo que sin duda también incrementa notablemente el riesgo de consumo de animales envenenados o de alimentos con mayor carga de tóxicos.

El Quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) es una especie longeva, amenazada, con una población europea de 170 territorios. La población española, con 121 territorios, es el núcleo principal en Europa y se han aplicado medidas para su conservación desde 1985. Sin embargo, en los últimos años, la población ha sufrido de bajas tasas de productividad y éxito reproductor que están afectando a la dinámica de la población y está amenazando su viabilidad a largo plazo. Evaluamos la idoneidad del estudio de la cáscara de los huevos utilizando microscopía electrónica de barrido para determinar las causas de fracaso reproductor; se han obtenido muestras de 8 cáscaras de huevos colectados antes del uso masivo de pesticidas y depositados en museos, y que nos han permitido caracterizar la ultraestructura normal de la cáscara del huevo de los Quebrantahuesos. La cáscara es trilaminar y reticular, con la porción calcificada compuesta por tres capas, como se ha descrito en otras Falconiformes, así como poros simples y careciendo de la capa cristalina superficial. Todos los parámetros ultraestructurales mostraron mayores rangos de variación de lo esperado, sugiriendo que el Quebrantahuesos tiene una alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Se han estudiado 27 huevos enteros y 90 cáscaras colectadas desde 1996 hasta 2013 en los Pirineos tras el fracaso reproductor y en colaboración con las autoridades medioambientales. Se investigaron también los niveles de pesticidas organoclorados y PCBs. Los análisis toxicológicos revelaron niveles muy bajos de contaminación, por lo que la contaminación por pesticidas organoclorados no era la causa del fallo reproductor. La fertilidad en la muestra actual es también mayor de lo esperado y el fallo reproductor se producía mayoritariamente al final de la incubación o en los primeros días de vida del pollo. Se ha encontrado que los huevos fértiles tenían mas longitud, cáscaras mas gruesas y mayores valores del Índice de Ratcliffe, siendo, por tanto, de mayor calidad. Desde 2006 el espesor de la cáscara y otros parámetros ultraestructurales están disminuyendo. Esta pérdida de calidad de los huevos desde 2006 está relacionada con las políticas sanitarias de la UE que han provocado un súbito descenso en la disponibilidad de cadáveres de animales domésticos y de recursos tróficos. Los cambios temporales encontrados en la carga de pesticidas organoclorados, que también se incrementa desde 2006, indica que los Quebrantahuesos están modificando sus estrategias de alimentación y búsqueda de alimento para explotar recursos de peor calidad y aumentando el riesgo de consumo de presas contaminadas o envenenadas.

The Bearded vulture (*Gypaetus barbatus*) is a long-lives threatened species with a European population of only 170 territories. The Spanish population, with 121 territories, is the largest European core, and conservation measures are being applied since 1985. However, in recent years, the population has been suffering from low rates of productivity and reproductive success which, in turn, are affecting the population dynamics and threatening its long-term viability. We evaluated the suitability of the study of eggshell using scanning electron microscopy in determining causes of breeding failure; eight samples from eggs collected prior to the massive use of pesticides were obtained from museums and allow us to characterize the normal ultrastructure of the Bearded vulture eggshell. The Bearded vulture eggshell is trilaminar and reticulate, with the calcified portion composed of three layers, as already described in other Falconiformes, and single pore channels and lacking the outer crystalline layer. All eggshell parameters showed higher range of variation than expected, suggesting that the Bearded vulture has a high capability for adaptation of different environmental conditions. From 1996 to 2013, in collaboration with the environmental authorities, 27 whole eggs and 90 eggshell fragments collected after breeding failure in nest of the Pyrenean population were studied. Levels of organochlorine pesticides and PCBs in whole eggs were also investigated. Toxicological analysis revealed low levels of contamination and, thus, that contamination with organochlorine pesticides was not the cause of breeding failure. Egg fertility was higher than expected in the studied sample and breeding failure was found to be mainly produced at the end of incubation or in the first days of the chick live. Fertile eggs were found to be longer, with thicker eggshells and higher Ratcliffe Index, thus showing better quality. From 2006 onwards, eggshell thickness and other eggshell parameters were decreasing. This lost of egg quality since 2006 was related to sanitary policies in the UE that caused sudden decrease in livestock carcasses and food shortages. Temporal changes in organochlorine levels also showed an increase since 2006, suggesting that the Bearded vultures are modifying their feeding and foraging strategies to exploit other food resources of lower quality and more contaminated, increasing the risk of consuming contaminated or poisoned preys.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía citada

Anderson, D.W., y Hickey, J.J. (1974). Eggshell changes in raptor from the Baltic region. *Oikos* 25: 395-401.

Anderson, R.E., Gay, C.V. y Schraer, H. (1981). Ultrastructural localization of carbonic anhydrase in the chorionallantoic membrane by immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 1121;1127.

Antor, R.J. (1998). Evolución demográfica de la población: Estimación de las tasas de supervivencia y del tamaño de la población preadulto de Quebrantahuesos en el Pirineo. Informe inédito. Diputación General de Aragón, Zaragoza.

Antor, R., Gil, J.A., Lorente, L.; Diez, O., y G. Báguena (2000). Observaciones de quebrantahuesos fuera de los Pirineos. *Quercus* 168: 10-14.

Antor, R., Margalida, A. y Heredia, R. (2005). Quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*). En: A. Madroño, C. González y J.C. Atienza (Eds.). Libro Rojo de las Aves de España. Dirección General de Conservación de la Biodiversidad-SEO/BirdLife España. Madrid. Pp: 125-129.

Antor, R., Margalida, A., Frey, H., Heredia, R., Lorente, L. y Sese, J.A. (2007) First breeding age in captive and wild bearded vultures *Gypaetus barbatus*. *Acta Ornithol* 42: 114–118.

Ar, A. y Rahn, H. (1978). Interdependence of gas conductance, incubation length and weight of the avian egg. In: Piper, J. (Ed). *Respiratory function in birds, adults and embryonic*. Springer-Verlag, Berlin. Pp: 227-238.

Ar, A. y Rahn, H. (1980). Water in the avian egg: overall budget of incubation. *Am. Zool.* 20: 373-384.

Ar, A., Paganelli, C.V., Reeves, R. B., Greene, D.G. y Rahn, H. (1974). The avian egg: water vapor conductance, shell thickness and functional pore area. *Condor* 76: 153-158.

Ar, A., Rahn, H. y Paganelli, C.V. (1979). The avian egg: mass and strength. *Condor* 81: 331-337.

Arias, J. L., Fernández, M.S. y Caplan, A.I. (1991a). Absence from avian eggshell membranes of epitopes recognized by antikeratin antibodies. *Poultry Sci.* 70:1647-1650.

Arias, J.L., Fernández, M.S., Dennis, J.E. y Caplan, A.I. (1991b). Collagen of the chicken eggshell membranes. *Conn. Tiss. Res.* 326: 37-45.

Arias, J.L., Fernández, M.S., Laraia, V.J., Janicki, J., Heuer, A.H. y Caplan, A.I. (1991d). The avian eggshell as a model of biomineralization. *Mat. Res. Symp. Proc.* 218: 193-201.

Arias, J.L., Carrino, D.A., Fernández, M.S., Rodríguez, J.P., Dennis, J.E. y Caplan, A.I. (1992). Partial biochemical and immunochemical characterization of avian eggshell extracellular matrices. *Archiv. Biochem. Biophys.* 298: 293-302.

Arias, J.L. y Fernández, M.S. (1993). Molecular control of avian eggshell biomineralization. *Proc. 5th Europ. Symp. Egg Quality & Egg Products, France*, pp.116-126.

Arias, J.L., Fink, D.J., Xiao, S.Q., Heuer, A.H. y Caplan, A.I. (1993). Biomineralization and eggshells. *Inter. Review Cytol.* 145: 217-250.

Arlettaz, R., Christe, P., Surai, P. F. y Møller, A. P. (2002). Deliberate rusty staining of plumage in the Bearded vulture: does function precede art? *Animal Behaviour*, 64, F1-F3.

Ash, J.S. y Taylor, A. (1964). Further studies on the effects of gamma BHC seed dressing on breeding pheasants. *Game Res. Asso. Annu. Rep.* 4: 14-20.

Balkan, M., Karakas, R. y Biricik, M. (2006). Changes in eggshell thickness, shell conductance and pore density during incubation in the Pecking Duck (*Anas platyrhynchos*). *Ornis Fennica* 83: 117-123.

Baluja, G. y Hernández, L.M. (1978). Organochlorine pesticide and PCB residues in wild bird eggs from the South-West of Spain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 655-664.

Baker, J.R. y Balch, D.A. (1962). A study of the organic material of hen's eggshell. *Biochem. J.*, 82: 352-361.

Becking, J.H. (1975). The ultrastructure of the avian eggshell. *Ibis* 117: 143-151.

Bellairs, R. y Boyd, A. (1969). Scanning electron microscopy of the shell membranes of the hen's egg. *Z. Zellforsch.*, 96: 237-249.

Bertran, J. y Margalida, A. (2002). Social organization of a trio of bearded vultures (*Gypaetus barbatus*): sexual and parental roles. *Journal of Raptor Research*, 36, 65-69.

Bland, D. (1992). Part E: Ultrastructure of Bald eagle eggshells from Arizona and relationships to egg quality. En: Hunt, G.H., Driscoll D.E., Bianchi, E.W. and Jackman, R.E. *Ecology of Bald Eagles in Arizona. BioSystems Analysis, Inc, Santa Cruz, California*. Pp: E73-E95.

- Bird, D.M., Peakall, D.B. y Miller, D.S.** (1983). Enzymatic changes in the oviduct associated with DDE-induced eggshell thinning in the Kestrel, *Falco sparverius*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 31: 22-24.
- Board, R.G.** (1981). The microstructure of avian eggshells, adaptative significance and practical implications in aviculture. Wildfowl 32: 152-156.
- Board, R.G.** (1982). Properties of avian egg shells and their adaptative value. Biol. Rev. 57:1-28.
- Bond, G.M., Board, R.G. y Scott, V.D.** (1988). A comparative study of changes in the fine structure of avian eggshells during incubation. Zool. J. Linn. Soc., 92:105-114.
- Brown, C.J. y Bruton, A.G.** (1991). Plumage colour and feather structure of the bearded vulture (*Gypaetus barbatus*). Journal of Zoology, 223, 627-640.
- Bunck, C.M., Spann, J.W., Pattee, O.H. and Fleming J.W.** (1985). Changes in eggshell thickness during incubation: implications for evaluating the impact of organochlorine contaminants on productivity. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 35:173-182.
- Bunk, M.J., Balloun, S.L.** (1978). Ultrastructure of the mammillary region of low puncture strength avian eggshells. Poultry Sci., 57:639-647.
- Burnett, L.J., Sorenson, K.L., Brandt, J., Sandhaus, E.A., Ciani, D., Clark, M., David, Ch., Theule, J., Kasielke, S. y Risebrough, R.W.** (2013). Eggshell thinning and depressed hatching success in California Condors reintroduced to Central California. The Condor 115 (3): 477-491.
- Burnham, W.** (1983). Artificial incubation of falcon eggs. J. Wildl. Managem. 47: 158-168.
- Carey, C.** (1980). Adaptation of the avian egg to high altitude. Am. Zool. 20: 449-459.
- Camps, M., Planas, J., Gómez-Catalán, J., Sabroso, M., To-Figueras, J. y Corbella, J.** (1989). Organochlorine residues in human adipose tissue in Spain: study of an agrarian area. Bull Environ Contam Toxicol 42: 195-201.
- Candlish, J.K.** (1969). L-5 hydroxylysine as a constituent of the shell membranes of the hen's egg. Int. J. Protein Res., 1:299-302.
- Carrete M., Donázar J.A. y Margalida A.** (2006). Density-dependent productivity depression in Pyrenean bearded vultures: implications for conservation. J. Appl. Ecol. 16: 1674-1682.
- Carrete M., Donázar J.A. y Margalida A. y Bertran, J.** (2006). Linking ecology, behaviour and conservation: does habitat saturation changes mating system in bearded vultures? Biol Lett 2: 624-627.

- Caussimont, G., Hunot, M. y Mariette, P.** (1995). A bathing Lammergeier. En: Frey, H., Schaden, G. y Bijleveld, M. (Eds.). Bearded vulture Annual Report 1995: 53.
- Cooke, A.S. y Balch, D.A.** (1970a). Studies of membrane, mammillary cores and cuticle of the hen eggshell. *Br. Poultry Sci.*, 11:345-352.
- Cooke, A.S. y Balch, D.A.** (1970b). The distribution and carbohydrate composition of the organic matrix in hen eggshell. *Br. Poultry Sci.*, 11:353-365.
- Cooke A.S.** (1979). Changes in eggshell characteristics of the Sparrowhawk and Peregrine associated to exposure to environmental pollutants during recent decades. *J. Zool. London* 187: 245-263.
- Cortivo, R., Castellani, I., Martelli, M., Michelotto, G. y Abatangelo, G.** (1982). Chemical characterization of the hen eggshell matrix: Isolation of an alkali-resistant peptide. *J. Chromatog.*, 237:127-135.
- Donázar, J.A., C.J. Palacios, L. Gangoso, O. Ceballos, M.J. González y F. Hiraldo** (2002). Conservation status and limiting factors in the endangered population of Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) in the Canary Island. *Biological Conservation*, 107: 89-97
- Donázar, J.A., Margalida, A., Carrete, M. y Sánchez-Zapata, J.A.** (2009). Too sanitary for vultures. *Science* 326: 664.
- Donázar, J.A., Cortés-Avizanda, A., y Carrete, M.** (2010). Dietary shifts in two vultures after the demise of supplementary feeding stations: consequences of the EU sanitary legislation. *Eur. J. Wildl. Res.* 56: 613–621.
- Eckert, J., Glock, H., Schade, R., Krampitz, G., Enbergs y H., Pettersen, J.** (1986). Synthesis of a precursor polypeptide of egg matrix in the liver of laying hen. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 56:258-265.
- Elliot J.E., Norstrom, R.J., Lorenzen, A, Hart L. E., Philibert, H., Kennedy, S. W., Stegeman, J.J., Bellward, G. D. y Cheng, K. M.** (1996a). Biological effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls in eggs of Bald eagles *Haliaeetus leucocephalus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 782-793.
- Elliot J.E., Norstrom, R.J. y Smith, G. E.** (1996b). Patterns, trends, and toxicological signatures of chlorinated hydrocarbons and mercury contaminants in Bald eagle eggs from the Pacific coast of Canada 1990-94. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 354-367.
- Elliot J.E., Langelier, K.M., Mineau, P. y Wilson, L.K.** (1996c). Poisoning of Bald eagles and Red-tailed hawks by carbofuran and fensulfotion in the Fraser Delta of British Columbia, Canada. *J Wildl. Dis* 32:486–491.

- Elliot J.E. y Norstrom, R.J.** (1998). Chlorinated hydrocarbon contaminants and productivity of Bald Eagle population on the Pacific coast of Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 1148-1153.
- Erben, H.K.** (1970). Ultrastrukturen und mineralisation rezenter und fossiler erschalen bei vogeln und reptilien. *Biomineralisation Forschungsberichtle* 1: 1-66.
- Fernández, M.S., Araya, M. y Arias, J.L.** (1997). Eggshell are shaped by a precise spatio-temporal of sequentially deposited macromolecules. *Matrix Biol.* 16: 13-20.
- Fitter, R.** (1973). *The Book of British Birds*. Drive Publications Ltd., London, UK.
- Fordberg, W. y Odsjo, T.** (1984). Influence from the embryonic developmenton hen eggs on calcium index measured by a X-ray Back-scatter method. *Ambio* 13: 40-42.
- Fox, G.A.** (1979). A simple method of predicting DDE contamination and reproductive success of population of DDE-sensitive species. *J. Appl. Ecol.* 16: 737-741.
- Franson, J.C.** (1996). Interpretation of tissue lead residues in birds other than waterfowl. In: Beyer, W.N., Heinz, G.H., Redmon-Norwood, A.W. (Eds.), *Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations*. SETAC, CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 265-279.
- Frey, H. y Roth-Callies, N.** (1994). Zur Genese der Haftfarbe (Rostfärbung durch eisenoxid) beim Bartgeier, *Gypaetus barbatus*. *Egretta*, 37, 1-22.
- Fujii, S.** (1974). Further morphological studies on the formation and structure of hen's eggshell by scanning micriscopy. *J.Fac.Fish. Anim. Husb.*,13:29-56.
- Fyfe, R.W., Riseborough, R.W. y Walker, L.** (1976). Pollutant effects on the reproduction of praire falcons and merlins of the Cnadian prairies. *Can. Fieldl. Nat.* 90: 346-355.
- García-Ruiz, J.M.** (1996). Estudio de las propiedades estructurales de los cascarones de huevo de *Aquila adalberti*. Informe Final Inédito. Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, CSIC, Granada. 101 pp.
- González, M.J., Rico, M.C., Fernández, M.C., Hernández, L.M. y Baluja, G.** (1983). Contaminación xenobiótica del Parque Nacional de Doñana. II. Residuos de insecticidas organoclorados, bifenilos policlorados, (PCBs) y metales pesados en Falconiformes y Strigiformes. Doñana, *Acta Vertebrata* 10: 177-189.
- González, L.M. e Hiraldo, F.** (1988). Organochlorine and heavy metal contamination in eggs of the Spanish Imperial Eagle (*Aquila adalberti*) and accompanying changes in eggshell morphology and chemistry. *Environm. Pollut.* 51: 241-258.

- González L.M., Margalida, A., Sánchez, R. y Oria, J.** (2006). Supplementary feeding as an effective tool for improving breeding success in the Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Biol. Conserv.* 129: 477–486.
- Gosler, A.G., Higham, J. y Reynolds, S.J.** (2005). Why are birds' eggs speckled? *Ecol. Letters* 8: 1105-1113.
- Green, R.E., Newton, I., Shultz, S., Cunningham, A.A., Gilbert, M., Pain, D.J. y Prakash, V.** (2004). Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian Subcontinent. *J. Appl. Ecol.* 41: 793-800.
- Green, R.E., Taggart, M.A., Das, D., Pain, D.J., Kumar, C.S., Cunningham, A.A. y Cuthbert, R.** (2006). Collapse of Asian vulture populations: risk of mortality from residues of the veterinary drug diclofenac in carcasses of treated cattle. *J Appl Ecol* 43: 949–956.
- Grubb, T.G.** (1986). Arizona Bald eagle research-1983-1985. Final Report. USDA Forest Service, Tempe, Arizona.
- Heaney, R.K. y Robinson, D.S.** (1976). The isolation and characterization of hyaluronic acid in eggshell. *Biochim. Biophys. Acta*, 451:133-142.
- Helander, B., Olsson, A., Bignert, A., Asplund, L. y Litzen, K.** (2002). The role of DDE, PCB, coplanar PCB and eggshell parameters for reproduction in the White-tailed Sea Eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Sweden. *Ambio* 31: 386-403.
- Henny, C. J., Blus, L. J. y Statfoerd, C. J.** (1983). Effects of heptachlor on American kestrels in the Columbia Basin, Oregon. *J. Wildl. Manage.* 47: 1080-1087.
- Heredia, R. y Sunyer, C.** (1989). Bearded vulture (*Gypaetus barbatus*) status in the Spanish Pyrenees and wing-tagging. First results. *Acta Biol Mont* 9: 39–44.
- Heredia, R.** (1991a). El Plan Coordinado de Actuaciones para la Protección del Quebrantahuesos. En: Heredia, R. y Heredia, B. (Eds.). *El Quebrantahuesos (Gypaetus barbatus) en los Pirineos*. Pp: 117-126. Colección Técnica, Madrid: ICONA.
- Heredia, R.** (1991b). Biología de la reproducción. En: Heredia, R. y Heredia, B. (Eds.). *El Quebrantahuesos (Gypaetus barbatus) en los Pirineos*. Pp: 117-126. Colección Técnica, Madrid: ICONA.
- Heredia, R. y Heredia, B.** (1991). *El Quebrantahuesos (Gypaetus barbatus) en los Pirineos*. Colección Técnica, Madrid: ICONA.
- Heredia, R. y M. Razin** (1999). Ecology and Conservation of the Bearded Vultures: The case of the Spanish and French Pyrenees. *Proceedings of the Bearded vulture Workshop*. 1998 Iraklio, Crete.

Heredia, R. (2003). Asesoría Técnica y Coordinación de la Estrategia para la Conservación del Quebrantahuesos en España. Memoria Técnica, Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid. Diciembre de 2003.

Heredia, R. y Margalida, A. (2005). Criterios de identificación del quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus barbatus*) en función de la edad y las características del plumaje. En: A. Margalida y R. Heredia (Eds.). Biología de la conservación del Quebrantahuesos *Gypaetus barbatus* en España. Pp 335–339. Madrid: Organismo Autónomo Parques Nacionales.

Hernández, L.M. y Baluja, G. (1976). Contaminación en huevos de aves silvestres del Suroeste de España por residuos organoclorados (insecticidas y bifenilos policlorados). Doñana, Acta Vertebrata 3: 157-170.

Hernández, L.M., Rico, M.C., González, M.J., Hernan, M.A. y Baluja, G. (1986). Presence and time trends of organochlorine pollutants and heavy metals in eggs of predatory birds of Spain. J. Field Ornithol. 57: 270-282.

Hernández, L.M., González, M.J., y Fernández, M.A. (1989). Organochlorines and metals in Spanish Imperial Eagle eggs, 1986-1987. Environ. Conserv. 15: 363-364.

Hernández L.M., Fernández M.A. y González M.J. (1989). Total PCBs and PCB congeners in Spanish Imperial Eagle eggs. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 43: 725-732.

Hernández, L.M., González, M.J., y Fernández, M.A. (1991). Lindane pollution near an industrial source in Northeast Spain. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 46: 9-13.

Hernández, M. (2001). Informe Anual sobre el Grado de Intoxicación de la Fauna en España, 1990-2001. Grupo de Trabajo de Ecotoxicología. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid. Informe Inédito.

Hernández, M. (2003). Vuelve la amenaza de los venenos. El futuro del quebrantahuesos en los Pirineos. Quercus 203: 24-29.

Hernández, M. (2005a). Efectos de la contaminación por pesticidas organoclorados en el Quebrantahuesos. En: Margalida, A., Heredia, R. (eds.) 2005. Biología de la Conservación del Quebrantahuesos *Gypaetus barbatus* en España: 175-188. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid.

Hernández, M. (2005b). Estudio de la ultraestructura y composición de la cáscara de los huevos de Quebrantahuesos y su aplicación en el manejo de la especie. En: Margalida, A., Heredia, R. (eds.) 2005. Biología de la Conservación del Quebrantahuesos *Gypaetus barbatus* en España: 189-204. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid.

Hernández M. y Margalida, A. (2008). Pesticide abuse in Europe: effects on the Cinereous vulture (*Aegypius monachus*) population in Spain. Ecotoxicology 17: 264–272.

- Hernández, M. González, L. M., Oria, J., Sánchez, R. y Arroyo, B.** (2008). Influence of contamination by organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls on the breeding of the Spanish Imperial Eagle (*Aquila adalberti*). Environ. Toxicol. Chem. 27 (2): 433-441. doi:[10.1897/07-308R.1](https://doi.org/10.1897/07-308R.1)
- Hernández M. y Margalida, A.** (2009). Poison-related mortality effects in the endangered Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) population in Spain Eur J Wildl Res. DOI 10.1007/s10344-009-0255-6.
- Hernández, M.** (2010). Informe anual sobre el grado de intoxicación de las especies del Catálogo Nacional de Especies Amenazadas. Informe Técnico, TRAGSEGA/Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- Hickey, J.J. y Anderson, D.W.** (1968). Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. Science 162: 271-273.
- Hiraldo, F., M. Delibes, y J. Calderon** (1979). El Quebrantahuesos *Gypaetus barbatus* (L.). Sistemática, taxonomía, biología y protección. Monografía 22. Ministerio de Agricultura. Madrid: ICONA.
- Houston, D.C., Hall, A. y Frey, H.** (1993). The characteristics of the cosmetic soils used by Bearded Vultures. Bull British ornithol. Club 113: 260-263.
- Hoyt, D.F.** (1979). Practical methods of estimating volume and fresh weight of bird eggs. Auk 96:73-77.
- Jenkins, M.J., Jurek, R.M., Garcelon, D.K., Mesta, R., Hunt, W.G., Jackman, R.E., Driscoll, D.E. y Riseborough, R.W.** (1994). DDE contamination and population parameters of Bald Eagles in California and Arizona, USA. In: Meyburg, MU & Chancellor, RD (Eds). Raptor Conservation Today. WWGBP, Berlin. Pp: 113-119.
- Kiff, L.F., Peakall, D.B. y Wilbur, S.R.** (1979). Recent changes in California Condor eggshells. Condor 81: 166-172.
- Krampitz, G. y Engels, J.** (1974). Water-soluble proteins from eggshell matrices. Protides BioI. Fluids. Proc. Colloq., 22: 327-331.
- Krampitz, G., Meisel, H. y Witt-Krause, W.** (1980). Identification of carboxy-glutamic acid in ovacalcin. Naturwissenschaften, 67: 38-39.
- Kutchai, H. y Steen, J.B.** (1971). Permeability of the shell and shell membranes of hen' eggs during development. Respiration Physiol. 11: 265-278.
- Lack, D.** (1968). Ecological adaptations for breeding in birds. Chapman and Hall, London.
- Leach Jr., R.M.** (1982). Biochemistry of the organic matrix of the eggshell. Poultry Sci., 61:2040-2047.

Longcore, J.R., Samson, F.B., Freitzer, J.F. y Spann, J.W. (1971). Changes in mineral composition of eggshells from Black ducks and Mallards fed DDE in the diet. *Bull. Environm. Contam, Toxicol.* 6: 345-350.

Margalida, A., Bertrán, J., García, D. y Heredia, R. (1997). Observaciones sobre el periodo de incubación del Quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) en los Pirineos. *Ecología* 11: 439-444.

Margalida, A. y Pelayo, R. (1999). Observation of a Pyrenean Bearded Vulture bathing in a ferruginous spring, In: Frey, H, Schaden, G & Bijleveld, M. (Eds). *Bearded Vulture, Annual Report.* IFBVC, Wassenaar, The Netherlands. Pp: 89-90. Wassenaar: IFBVC.

Margalida, A. y Bertran, J. (2000). Breeding behaviour of the Bearded vulture *Gypaetus barbatus*: Minimal sexual differences in parental activities. *Ibis*, 142, 225–234.

Margalida, A., Bartoli, M y Boudet, J. (2001). Laying date delayed and clutch replacement in Bearded vulture (*Gypaetus barbatus*) in the Pyrenees. *Vulture News* 44: 27-30.

Margalida, A. y Bertran, J. (2001). Function and temporal variation in use of ossuaries by Bearded vultures (*Gypaetus barbatus*) during the nestling period. *Auk* 118: 785-789.

Margalida, A. y García, D. (2002). Pla de Recuperació del Trencalós a Catalunya. Biología y Conservació. Documents and Quaderns de Medi Ambient 7. Barcelona: Generalitat de Catalunya. Departament de Medi Ambient.

Margalida, A. y Bertran, J. (2003). Inter and intraspecific kleptoparasitism interactions of the Bearded Vulture *Gypaetus barbatus* at nestling areas. *J. Raptor Res.* 37: 157-160.

Margalida, A, García, D., Bertran, J. y Heredia, R. (2003). Breeding biology and success of the Bearded vulture (*Gypaetus barbatus*) in the eastern Pyrenees. *Ibis* 145: 244-252.

Margalida, A, Bertran, J., Boudet, J. y Heredia, R. (2004). Hatching asynchrony, sibling aggression and cannibalism in the bearded vulture (*Gypaetus barbatus*). *Ibis* 146: 386–393.

Margalida, A. y Bertran, J. (2005). Territorial defence and agonistic behaviour of breeding Bearded Vultures *Gypaetus barbatus* toward conspecifics and heterospecifics. *Ethol. Ecol. Evol.* 17: 51-63.

Margalida, A. y Heredia, R. (2005). Biología de la Conservación del Quebrantahuesos *Gypaetus barbatus* en España. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid.
Margalida, A. y Bertran, J. (2006). Prolonged incubation of non-viable eggs in the Bearded Vulture *Gypaetus barbatus*. *Acta Ornithol.* 41 (2): 181-184.

Margalida, A., Heredia, R., Razin, M. y Hernández, M. (2008). Sources of variation in

mortality of the Bearded vulture *Gypaetus barbatus* in Europe. *Bird Conserv. Int.* 18: 1-10.

Margalida, A., Bertran, J. y Heredia, R. (2009). Diet and food preferences of the endangered Bearded Vulture *Gypaetus barbatus*: A basis for their conservation. *Ibis* doi: 10.1111/j.1474-919x.2008.00904.x

Margalida, A., Donázar, J.A., Carrete, M. y Sánchez-Zapata, J.A. (2010). Sanitary versus environmental policies: fitting together two pieces of the puzzle of European vulture conservation. *J. Appl. Ecol.* 47: 931-935.

Margalida, A., Colomer, M.A. y Oro, D. (2014). Man-induced activities modif. Demographic parameters in a long-lived species: effects of poisoning and health policies. *Ecol. Appl.* 24 (3): 436-444.

Margalida, A. y Colomer, M.A. (2012). Modelling the effects of sanitary policies on European vulture conservation. *Scientific Reports* 2: 753.

Massaro, M. y David, L. S. (2004). The influence of laing date and maternal age on eggshell thickness and pore density in Yellow-eyed Penuins. *The Condor* 106: 496-505.

Massaro, M. y David, L.S. (2005). Differences in egg size, shell thickness, pore density, pore diameter and water vapour conductance between first and second eggs of Snares Penguins *Eudyptes robustus* and their influence on hatching asynchrony. *Ibis* 147: 251-258.

Masshof, F.B. y Stolpmann, P.A. (1961). The microscopic structure of the eggshell matrix as influenced by shell thickness and environmental temperature. *Poultry Sci.* 41: 963-970.

Mcfarland, L.L., Garrett, R.L. y Nowell, J.A. (1971). Normal eggshells and thin eggshells caused by organochlorine insecticides viewed by the scanning electron microscope. *Proc. Ann. Scan. Elect. Microsc. Symp.* 4: 377-384.

McLane M.A. y Hughes, D.L. (1980). Reproductive success of screech owls fed Aroclor 1248. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 9: 661-665.

Mestres, R. (1999). Componentes químicos medioambientales y fertilidad. *Ann. Real Soc. Esp. Químicos*, Enero 1991: 42-46.

Mikhailov, K.E. (1974). Principles of organization of ammotic eggshells as biogenic formation. *Z.H. Obsch. Biol.* 55: 535-547.

Mikhailov, K.E. (1977). Avian Eggshells: An Atlas of Scanning Electron Micrographs. BOC Occasional Publications: 3. British Ornithologists' Club, Tring, UK.

Mineau, P., Fletcher, M.R., Glaser, L.C., Thomas, N.J., Brassard, C., Wilson, L.K., Elliot, J.E., Lyon, L.A., Henny, C.J., Bollinger, T. y Porter, S.L. (1999). Poisoning of

raptors with organophosphorus and carbamate pesticides with emphasis in Canada US and UK. *J Raptor Res* 33:1–37.

Newton, I. y Bogan, J. (1978). The role of different organochlorine compounds in the breeding of British Sparrowhawks. *J. Appl. Ecol.* 15: 105-116.

Negro, J.J., Margalida, A., Hiraldo, F. y Heredia, R. (1999). The function of cosmetic coloration of Bearded Vultures: when art imitates life. *Anim. Behav.* 58: 14-17.

Noble, D.G., Elliot, J.E., y Shutt, J.L. (1993). Environmental contaminants in Canadian raptors, 1965-1989. *Can. Wildl. Serv. Tech. Rep. Ser. No. 91*, Canadian Wildlife Service, Ottawa, Canada.

Nys, T., Hincke, M.T., Arias, J.L., García-Ruiz, J.M. y Solomon, S.E. (1999). Avian eggshell mineralization. *Poultry Avian Biol. Reviews* 10: 143-166.

Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., et al., (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427: 630–633.

Ohlendorf, H.M., Klaas, E.E. y Kaiser, T.E. (1978). Environmental pollutants and eggshell thinning in the black-crowned night heron. *Wading Birds, Research Report No 7*. US Fish & Wildlife Service, Washington DC, USA. 32 pp.

Oro, D., Margalida, A., Carrete, M., Heredia, R. y Donazar, J.A. (2008). Testing the Goodness of Supplementary Feeding to Enhance Population Viability in an Endangered Vulture. *PLoS ONE* 3: e4084.

Peakall, D.B. y Kiff, L.F. (1979). Eggshell thinning and DDE residue levels among peregrine falcons (*Falco peregrinus*): a global perspective. *Ibis* 121: 200-204.

Paganelli, C.V. (1980). The physics of gas exchange across the avian eggshell. *Amer. Zool.*, 20: 329-338.

Pain, D.J., Carter, I., Sainsbury, A.W., Shore, R.F., Eden, P., Taggart, M.A., Konstantinos, S., Walker, L.A., Meharg, A.A. y Raab, A. (2007). Lead contamination and associated disease in captive and reintroduced red kites *Milvus milvus* in England. *Sci. Tot. Environ.* 376: 116–127.

Peakall, D.B. (1996). Dieldrin and other cyclodiene pesticides in wildlife. En: Beyer, W.N., Heinz, G.H. y Redmon-Norwood, A.W., (Eds.), *Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp. 73-98.

Parsons, A.H. (1982). Structure of the eggshell. *Poultry Sci.* 61: 2013-2021.

Peebles, E.D. y Brake, J. (1985). Relationships of eggshell porosity to stage of embryo development in broiler breeders. *Poultry Sci.*, 64: 2388-2391.

- Purkyne, J.** (1855). O vytvorovani vejce uvniti tela slepiciho 11,111, Ziha, Praha, 3:74-79,333341.
- Rahn, H y Ar, A.** (1974). The avian egg: incubation time and water loss. Condor 76: 147-152.
- Rahn, H., Carey, C., Balmas, K., Bhatia, B. y Paganelli, C.V.** (1979). Reduction of pore area of the avian eggshell as an adaptation to altitude. Proceed. Nat. Acam. Sciences 74: 3075-3078.
- Rahn, H. y Ar, A.** (1980). Gas exchange of the avina egg : time, structure and function. Am. Zool. 20 : 477-484.
- Ratcliffe, D.A.** (1967). Decrease in eggshell weight in certain birds of prey. Nature 215: 208-210.
- Ratcliffe D.A.** (1970). Changes attributable to pesticides in egg breakage frequency and eggshell thickness in some British birds. J. Appl. Ecol. 7: 67-115.
- Risebrough, R.W. y Peakall, D.B.** (1988). The relative importance of several organochlorines in the decline of peregrine falcon populations. In Cade, T.J., Enderson, J.H., Thelander, C.G., White, C.M., (Eds.), Peregrine Falcon Populations: Their Management and Recovery. Peregrine Fund, Boise, ID, USA, pp 449-462.
- Schade, R.** (1987). Biochemical and molecular genetic aspects of egg shell formation. Arch. Gefluegelkd., 51:81-87.
- Schaub, M., Zink, R., Beissmann, H., Sarrazin, F. y Arlettaz, R.** (2008). When to end releases in reintroduction programmes: demographic rates and population viability analysis of bearded vultures in the Alps. J. Appl. Ecol. 22: 114-118.
- Schmidt, W.J.** (1962). Leigt der gierschalenkalk der vögel als submikroskopische kristallite vor. Zietsch. Für Zellforschung. 57: 848-880.
- Seguin, J.F., Torre, J., Thibault, J., Hugot, L., Robert, I. y Bretagnolle, V.** (2002). Evolution de la population insulaire de Gypaète barbu (*Gypaetus barbatus*) de Corse au cours de vingt dernières années. En: LPO-FIR (Eds.). Proceedings of the International Conference "Conservation of Bearded vulture popualtions": 83-87.
- Sesé, J.A., Antor, R.J., Alcántara, M., Ascaso, J.C. y Gil, J.A.** (2005). La alimentación suplementaria en el quebrantahuesos: estudio de un comedero del Pirineo occidental aragonés. In: Margalida A., Heredia R., (Eds.), Biología de la conservación del Quebrantahuesos *Gypaetus barbatus* en España. Madrid: Organismo Autónomo Parques Nacionales. pp 279-304.
- Simkiss, K. y Tyler, C.** (1957). A histochemical study of the organic matrix of hen eggshells. Q.J. Microsc. Sci., 98: 19-28.

- Simkiss, K.** (1961). Calcium metabolism and avian reproduction. *Biol. Rev.* 36: 321-367.
- Simons, P.C. y Wiertz, G.** (1966). The ultrastructure of the surface of the cuticle of the hen's egg in relation to egg-cleaning. *Poult. Sci.* 45 : 153-1162.
- Simons. P.C.** (1971). Ultrastructure of the hen eggshell and its physiological interpretation Ph.D. Thesis. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, Holland.
- Simons. P.C.** (1979). Utrastructure of hen eggshell and its physiological interpretation. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation.
- Soliman, F.N., Rizk, R.E. y Brake, J.** (1994). Relationship between shell porosity, shell thickness, egg weight loss and embryonic development. *Poultry Sci.* 73: 1607-1611.
- Solomon, S.E.** (1997). Egg & eggshell Quality. Mansosn Publ. Ltd, London. 149 pp.
- Stonehouse, B.** (1966). Egg volumes from linear dimensions. *Emu* 65: 227-228.
- Tella, J.L.** (2001). Action is needed now, or BSE crisis could wipe out endangered birds of prey. *Nature* 410: 408.
- Tullet, S.G.** (1975). Regulation of avian eggshell porosity. *J. Zool. London* 117: 339-348.
- Tullet, S.G, y Board, R.G.** (1977). Determinants of avian egg porosity. *J. Zool. Lond.* 183: 205-211.
- Tullet, S.G.** (1984). The porosity of avian eggshells. *Comp. Biochem. Physio.* 78: 5-13.
- Tyler, C. y Simkiss, K.** (1958). Studies on the eggshells. VIII: The determination of membrane pore and matrix protein- a reassessment. *J. Sci. Food Agricu.* 9: 375-380.
- Tyler, C.** (1964). A study of the eggshell of Anatidae. *Proc. Zool. Soc. London* 142: 1-19.
- Tyler, C.** (1966). A study of eggshells of Falconiformes. *J. Zool. London* 150: 413-425.
- Tyler, C.** (1969a). A study of the egshells of Gaviiformes, Procellariiformes and Pelecaniformes. *J. Zool. Lond.* 158: 395-412.
- Tyler, C.** (1969b). Avian eggshells: their structure and characteristics. *Int, Rev. Gen. Exp. Zool.* 4: 81-130.
- Tyler, C. y Fowler, S.** (1978). The distribution of avian cores, cones, cone junctions and pores in the eggshells of wild birds. *J. Zool. Lond.* 186: 1-14.
- Wedral, E.M., Vadehra, D.V. y Baker, R.C.** (1974). Chemical composition of the cuticle and the inner and outer membranes from eggs of Gallus. *Comp.Biochem. Physiol.*, 47:13:631-640.

Wiemeyer, S.N., Jurek, M. y Moore, J.F. (1986). DDE, DDT and dieldrin: residues in american kestrels and relations to production. US Fish y Wildl. Serv. Tech. Rep.6, 33 pp.

Wiemeyer, S.N., T.G. Lamont, C.M. Bunck, C.R. Sindelar, F.J. Gramlich, y Fraser, J.D. (1984). Organochlorine pesticide, polychlorobiphenyl, and mercury residues in Bald Eagle eggs—1969–79—and their relationships to shell thinning and reproduction. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 13: 529–249.

Wiemeyer, S.N., C.M. Bunck, y C.J. Stafford. (1993). Environmental contaminants in Bald Eagle eggs 1980–84 and further interpretations of relationships to productivity and shell thickness. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 24: 213–227.

Wiemeyer, S.N. (1996). Other organochlorine pesticides in birds. En: Beyer, W,N,, Heinz, G.H., Redmon-Norwood, A.W., (Eds.), Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentration. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 99-116.

Woodley, S.J., Meyer, K.D., Kirk, D.A. y Pearce, P.A. (2004). Contaminant levels. Eggshell thinning and productivity in Sharp-shinned hawks in Fundy National Park, New Brunswick. J. Raptor Res. 38 (1): 69-77.

Xirouchakis, S, Saloulis, A. y Andreou, G. (2001). The decline of the Bearded vulture in Greece. Ardeola 48: 183-190.

Zimmermann, K. y Hipfner, J. M. (2007). Egg size, eggshell porosity and incubation period in the marine bird family Alcidae. The Auk 124 (1). 307-315.

Zuberogoitia, I., Martínez, J.E., Margalida, A., Gómez, I., Azkona, A. y Martínez, J.A. (2010). Reduced food availability induces behavioural changes in Griffon vulture. Ornis Fennica 87: 52–60.

ANEXO I. HUEVOS DE QUEBRANTAHUESOS DEPOSITADOS EN MUSEOS

MUSEO	REGISTRO	LOCALIDAD	FECHA	L	A
BMNH	1941.1.7.829	French Pyrénées	06.02.1893	76.6	63.9
BMNH	1941.1.6.844	Pyrénées	02.1868	91.8	71.9
BMNH	1972.13.87	Pyrénées	1867	84.8	64.5
BMNH	1972.13.87	Pyrénées	1867	79.5	62.9
BMNH	1941.1.6.846	Spanish Pyrénées	02.1868	87.8	65.8
BMNH	1972.11.16	Spain	1864	86.6	66.9
BMNH	1.7287.81.01	Spanish Pyrénées	1869	85.4	65.4
BMNH	1.7287.81.01	Spanish Pyrénées	1869	82.6	65.9
BMNH	1941.1.1.6.845	Pyrénées	Sin Fecha	78.7	65.5
BMNH	1972.11.18	Spain	1868	81.2	66.7
BMNH	1.72901.1	Spanish Pyrénées	18.01.1876	86.0	68.8
BMNH	1.7290.01.1	Spanish Pyrénées	1869	75.9	64.7
BMNH	1972.11.19	Spain	1858	84.3	62.1
BMNH	1972.12.1	Pyrénées	Sin Fecha	Roto	
BMNH	1972.12.1	Pyrénées	Sin Fecha	Roto	
BMNH	1972.12.1	Pyrénées	Sin Fecha	Roto	
BMNH	1941.1.6.849	Sierra Ronda, Málaga	20.01.1909	85.6	65.9
BMNH	1.7291.01.2.1	Sierra Nevada, Spain	01.02.1873	79.8	65.4
BMNH	1.7291.01.2.1	Sierra Nevada, Spain	01.02.1873	77.4	64.6
BMNH	1941.1.7.826	Castillón del Mayo, Málaga	03.1887		
BMNH	1941.1.7.828	Castillón del Mayo	03.1887		
BMNH	1972.11.17	South Spain	07.02.1872	81.8	62.4
BMNH	1941.1.6.848	Sierra Ronda	06.01.1906	84.8	64.1
BMNH	1941.1.6.848	Sierra Ronda	06.01.1906	84.0	65.7
BMNH	10.5141.14.2.I	Sierra Huéjar	31.01.1884	86.0	67.7
BMNH	10.5141.14.2.I	Sierra Huéjar	31.01.1884	82.1	66.0
BMNH	1969.3.16	Souyth Spain	1889	96.4	72.4
BMNH	1925.12.25.40	Castello del Hoyo, nr Málaga	23.03.1883	83.7	65.3
ZFMK	No referencia	Antequera (S. Spain)	21.01.1895	77.3	65.5
ZFMK	No referencia	Sierra Nevada, Granada	22.01.1899	77.1	63.2
ZFMK	No referencia	Sierra Nevada, Granada	17.01.1899	81.0	61.4
ZFMK	No referencia	Sierra Nevada, Granada	05.01.1899		
ZFMK	No referencia	Sierra Nevada, Granada	16.01.1899	80.3	64.4
ZFMK	No referencia	Sierra Nevada, González	05.01.1907	85.7	66.7
ZFMK	No referencia	Sierra Ronda, González	02.02.1907	81.5	68.9
ZFMK	No referencia	Sierra Antequera, J. Macia	10.01.1911	87.0	66.5
ZFMK	No referencia	Córdoba, J. Macia	02.03.1911	85.0	65.8
ZFMK	No referencia	Spanien	05.03.1908	81.4	65.0
ZFMK	No referencia	Spanien	ant. 1907	87.1	67.9
ZFMK	No referencia	Lanjaron, Sierra Nevada	30.12.1894	87.8	68.8
ZFMK	No referencia	Sierra Nevada, Granada	05.01.1895	82.1	60.7

MUSEO	REGISTRO	LOCALIDAD	FECHA	L	A
ZFMK	No referencia	Sierra Junquera, Málaga	08.01.1895	82.1	60.7
ZFMK	865/96	Le Vignemale, Pyrénées (Fr)	06.02.1893	76.6	63.9
ZFMK	866/96	Pyrenäen	21.03.1877	78.8	64.3
ZFMK	No referencia	Sierra Baza, Granada	27.12.1898	79.6	62.3
ZFMK	No referencia	Chorro	10.01.1899	87.7	70.1
ZFMK	No referencia	Aracena, Andalusien. Grenze	21.01.1900	88.1	70.7
ZFMK	No referencia	Sierra Nevada, Granada	11.02.1908	81.9	65.6
ZFMK	No referencia	Sierra Nevada, Granada	14.01.1891	77.0	63.2
ZFMK	No referencia	Sierra Gaitanes	14.01.1891	80.1	65.0
MHNT	946/96	Port D'Oo, Pyrénées	16.02.1877	81.1	63.8
MHNT	947/96	Portillon D'Oo, Hte Gne	20.01.1876	86.4	66.7
MHNT	948/96	Mount. Cabrioules, Luchon	10.01.1877	85.1	68.4
MHNT	949/96	Bayone, Baisses Pyrénées	Sin Fecha	81.4	64.2
Leiden	No referencia	Nr Málaga	03.02.1908	80.9	62.8
Leiden	No referencia	Sierra Morena, Córdoba	10.01.1896	86.5	67.1
Leiden	No referencia	Cádiz	29.12.1895	81.0	66.0
Leiden	No referencia	Cádiz	29.12.1895	85.5	70.5
Leiden	No referencia	Sierra Nevada	28.02.1887	82.1	65.7
SMNS	No referencia	Spanische Pyrenäen	1860	83.7	66.2
SMNS	No referencia	Le Vignemale, French Pyr.	1854	82.3	66.8
MHNP	No referencia	Andalusia	06.01.1884	86.0	65.0
MHNP	No referencia	Andalusia	06.01.1844	82.5	63.0
NMSF	No referencia	Sierra Alfánada (SO Esp.)	19.06.1897	72.5	63.8
NMSF	No referencia	Sierra Alfánada (SW Sp.)	19.06.1897	83.1	63.5
MNHUB	No referencia	South Spain	01.01.1888	89.0	65.6
MNHUB	No referencia	South Spain	01.01.1888	82.2	63.7
MHNG	819.97	Pyrénées	1868	83.0	65.0
MHNB	3-26 S.Pyr	Spanische Pyrenäen 1626-B	28.03.1907	85.8	68.3

LEYENDA

BMNH British Museum Natural History, Tring, UK.

ZFMK Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, Bonn (Alemania)

MHNT Museum de Historie Naturelle, Toulouse, Francia

LEIDEN Rijksmuseum van Natuurlijke Historie, Leiden, Holanda

SMNS Städtisches Museum für Naturkunde, Stuttgart (Alemania)

MHNP Museum de Historie Naturelle, Paris, Francia

NMSF Natur-Museum Senckenberg, Frankfurt (Alemania)

MNHUB Museum für Naturkunde, Humboldt Universität, Berlin (Alemania)

MHNG Museum de Historie Naturelle, Ginebra, Suiza

MHNB Museum de Historie Naturelle, Berne, Suiza

L Longitud del huevo (mm)

A Anchura del huevo (mm)

**ANEXO II. ETIQUETAS DE HUEVOS DEL BRITISH MUSEUM NATURAL
HISTORY, TRING, HERTFORDSHIRE, UK.**

BRITISH MUSEUM—(NAT. HIST.)

Reg. No. 1921.1.7821

Locality		Gybaetus barbatus aureus	
Sierra Nevada		European Banded Mistle	
Date	February 1. 1878	Set Mark	No. 2298 2298
Gybaetus barbatus 2 eggs in nest		No. of Eggs 2	
One egg missing and believed stolen, 8 Oct. 1979 MPW			
It is the sound egg. 1292.			

BRITISH MUSEUM—(NAT. HIST.)

Reg. No. 1918.9.1.1716

Locality		Pyrenees	
Date		2. 68	
Set Mark	186.e*	No. of Eggs	1
* Not a Buckley, Tristram or Whitehead reference MPW			

GYPAETUS BARBATUS AUREUS

Locality		Pyrenees	
Date		1867	
Set Mark	A 700	No. of Eggs	c/2

The clutch apparently passed through the hands of both the collectors mentioned. It is not clear who had it first or which, if either, was the collector.

Gp. 872/1 Wt. 28485. C.P. 10M. 7/53

BRITISH MUSEUM (NATURAL HISTORY)

Reg. No. 1941.1.7.828

Locality		GYPÆTUS BARBATUS AUREUS	
Castillon del Mayo		Collector E. Bidwell	
Date	March 1887	Set Mark	No. of Eggs 2
Butler Cat. p 353 ref. no 340			
"2 eggs at Stevens auction rooms, 38 King St. Covent Garden Market, London. 23 June 1903. belonging to E. Bidwell ... price £4.00"			

BRITISH MUSEUM (NATURAL HISTORY)

Reg. No. 1918.9.1.1716

GYPAETUS BARBATUS AUREUS

Locality		Spanish Pyrenees	
Date		February 1868	
Set Mark	140	No. of Eggs	1

Buckley Cat. p 140 "From H.E. Dresser, July 27th 1870. 'From Fairmaire of Paris'. On a label on the egg 'Gypaetus barbatus. E. Fairmaire. Spanish Pyrenean Mts. 1868. Febry. '"

Registered as part of the Charles Rothschild Colln

Dd. 533323 7263264 H.M. 10M 12/77

GYPAETUS BARBATUS AUREUS

Locality		Spain	
Date		1864	
Set Mark	data	No. of Eggs	1

BRITISH MUSEUM—(NAT. HIST.)

Reg. No. 1972.11.16

BRITISH MUSEUM (NATURAL HISTORY)

Reg. No. 1972.11.18

GYPAETUS BARBATUS AUREUS			
Locality	Date	Set Mark	No. of Eggs
Spain	1868	data	1
Collector	Rothschild Bequest		

BRITISH MUSEUM (NAT. HIST.)

Reg. No. 10.5741-2 1

Gypaetus barbatus aureus European Bearded Vulture			
Locality	Date	Set Mark	No. of Eggs
Hugar Spain	January 31. 1884	40	2
Collector	Dr. A. C. Stark		

BRITISH MUSEUM (NAT. HIST.)

Reg. No. 1972.11.18

Gypaetus barbatus ^{AUREUS} European Bearded Vulture			
Locality	Spanish Pyrenees		Collector
Date	1869	Set Mark	No. of Eggs 2
Gypaetus barbatus			
These two eggs may possibly be a clutch.			
Found missing and believed stolen, 8 Oct. 1979 MPW			
Ex H. Seeborn Coll			

BRITISH MUSEUM (NAT. HIST.)

Reg. No. 1972.11.17

GYPAETUS BARBATUS AUREUS			
Locality		Collector	
South Spain		Roedern Collection Rothschild Bequest	
Date	Set Mark	No. of Eggs	
7 February 1872	data	1	
Gp. 872/1 Wt. 28485. C.P. 10M. 7/63			

BRITISH MUSEUM NATURAL HISTORY

Reg. No. 1919.1.1.6.81.8

GYPAETUS BARBATUS AUREUS			
Locality		Collector	
Sierra Ronda, Spain		[Schlüter's] Rothschild Bequest	
Date		Set Mark	No. of Eggs
6 Jan 1906	-	-	c/2
Found missing & believed stolen, 8 Oct. 1979 MPW			
Name: <i>Gypaetus barbatus</i>			
Gelegé: 2 Dat. 6/06 No 2			
Fundort: <i>Sierra Ronda</i> <i>Spanien</i>			
Wilh. Schlüter, Halle a. S. Naturalien- und Lehrmittelhandlung.			

BRITISH MUSEUM (NAT. HIST.)

Reg. No. 1972.11.18

Gypaetus barbatus AUREUS			
Locality Pyrenees		Collector Ch. Rothschild Colln	
Date No date	Set Mark	No. of Eggs. /	
Found missing and believed stolen, 8 Oct 1979 MPW			

BRITISH MUSEUM—(NAT. HIST.)

Reg. No. 172891

Ex H. Seabrook in Care

Locality		Collector	No. of Eggs
Spanish Pyrenees			
Date	Set Mark		
January 18. 1876.		1	

Gypaetus barbatus pyrenaicus
Aureus
European Bearded Vulture

BRITISH MUSEUM—(NAT. HIST.)

Reg. No. 172901

Ex H. Seabrook in Care

Locality		Collector	No. of Eggs
Spanish Pyrenees			
Date	Set Mark		
1879.		1	

Gypaetus barbatus pyrenaicus
Aureus
European Bearded Vulture

BRITISH MUSEUM—(NAT. HIST.)

Reg. No. 1972.12.1

GYPAETUS BARBATUS AUREUS

Locality		Collector	
Pyrenees ?		Verreaux ?	
Date	Set Mark	No. of Eggs	
---	---	3	

3 eggs, cracked, found in a broken box among junk cleared out of store. Their origin is dubious.

One egg found missing and presumed stolen, 8 Oct. 1979. This is surprising in view of the dubious nature of the specimen, unless it was coupled with 1901.1.1.7292 to make a spurious clutch for sale to a gull! MPW

Gp. 872/1. Wt. 28485. C.P. 10M. 7/83

BRITISH MUSEUM (NATURAL HISTORY)

Reg. No. 1972.11.19

GYPAETUS BARBATUS AUREUS

Locality		Collector	
Spain		Verreaux Roedern Collection Rothschild Bequest	
Date	Set Mark	No. of Eggs	
1858	data	1	

BRITISH MUSEUM (NATURAL HISTORY)

Reg. No. 1969.3.16

GYPAETUS BARBATUS AUREUS ?

Locality		Collector	
South Spain		Presented by Rear-Admiral Sir Gerald St. John	
Date	Set Mark	No. of Eggs	
1889	14(a)	1	

If this egg is correctly identified, it is very badly faded. MPW

Dd. 533323 7263264 H.M. 10M 11/77

BRITISH MUSEUM—(NAT. HIST.)

Reg. No. 1925.12.25.40

Gypaetus barbatus hemachalams
Aureus

Locality		Collector	
Castello del Hoyo, nr Malaga, Spain		from J. J. Delgleish	
Date	Set Mark	No. of Eggs	
23. III. 83		1	

Found missing and believed stolen, 8 Oct. 1979 MPW

BRITISH MUSEUM (NATURAL HISTORY)
1941.1.7.829
Reg. No.

GYPÆTUS BARBATUS AUREUS

Locality French Pyrenees	Collector Dr. Koenig Butler Collection
Date 6 Feb. 1893	No. of Eggs 1

cannot find in Butler Cat.

BRITISH MUSEUM NATURAL HISTORY
1941.1.6.849
Reg. No.

GYPÆTUS BARBATUS AUREUS

Locality Sierra Ronda, Malaga, Spain	Collector [Schlüter's] Rothschild Bequest
Date 23 Jan 1909	No. of Eggs 1

Name: *Gypætus barbatus*
Gelege: 1 Dat.: *27/09 1867/5*
Fundort: *Sierra Ronda bei Malaga, Spanien*
Wilh. Schlüter, Halle a. S.
Naturalien- u. Lehrmittelhandlung.